

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO
DEPARTAMENTO DE PATOLOXÍA ANIMAL

EFECTO DE LA RAZA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE COBRE EN TERNEROS DE CEBO

Memoria presentada por la licenciada Dña. Betiana A. Gutiérrez Álvarez
para optar al grado de Doctora en Veterinaria

Lugo, noviembre de 2007

D. JOSE LUIS BENEDITO CASTELLOTE, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal, Dña. M. MARTA LÓPEZ ALONSO, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal y Dña. MARTA I. MIRANDA CASTAÑÓN, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada “Efecto de la raza sobre la acumulación de cobre en terneros de cebo”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. BETIANA A. GUTIÉRREZ ÁLVAREZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Patología Animal de la Universidade de Santiago de Compostela y, en opinión de los abajo firmantes, este trabajo reúne las condiciones legales para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente informe en Lugo a trece de noviembre de 2007.

Fdo. José Luis Benedito Castellote

Fdo. M. Marta López Alonso

Fdo. Marta I. Miranda Castañón

A mi Familia

A mis Amigos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Profesor Dr. D. José Luis Benedito Castellote, Director de la presente Tesis Doctoral, por brindarme esta gran oportunidad y abrirme las puertas de España y de la Facultad de Veterinaria de Lugo, así como su apoyo y ayuda inestimables.

Las Profesoras Doctoras Dña. Marta López Alonso y Dña. Marta Miranda Castañón, codirectoras de la presente Tesis, por su ayuda, guía y paciencia para la realización de este trabajo.

Los Profesores Doctores D. Joaquín Hernández Bermúdez y Dña. Cristina Castillo Rodríguez por su constante apoyo y cariño durante todo este tiempo.

Mis compañeros del Departamento de Patología General, Patricia, Victor, Marco, Mayte e Isabel por su constante colaboración, su compañía y por soportarme en el día a día.

Dr. D. Jesús Velasco Pastor por convertir nuestros muestreos en una cita tan deseada, por su disposición, por las risas, los momentos musicales y su amistad sincera.

D. Delfín Olmos Luciañez, propietario del Establecimiento Nadela, por su colaboración y predisposición para la realización de las tareas de campo.

Al Dipartimento Clínico Veterinario de la Universidad de Bologna (Italia), especialmente al Prof. Paolo Famigli Bergamini y al. Prof Arcángelo Gentile por coordinar mi estancia y abrirme las puertas del Hospital Clínico permitiéndome enriquecer este trabajo con una magnífica experiencia clínica.

A los compagni del establecimiento Stalla dell' Oppio (Módena), Vet. Andrea, Franca y Saverio por permitirnos alborotar su rutina, por su colaboración y paciencia. Pero muy especialmente al Dr Giovanni Bernardini por demostrarme que la generosidad, el cariño y la amistad no conocen de idiomas.

A toda la gente de Italia que se cruzó en mi camino e hizo de mi estancia una experiencia inolvidable, Giuseppe, Nicoletta, Emanuella, Silvio, Miguele, Andrea, Moira y en especial a Luca...a tutti voi grazie mille.

A mis Jefes y Amigos del Área Clínica Médica y Quirúrgica de Rumiantes de la Universidad de Buenos Aires por acompañarme en esta aventura y brindarme sus constantes consejos, apoyo y cariño. Especialmente a los Doctores Roberto Perna, Eloy Fernández, Mariano Nahum, Diego Stewart, Marcelo Tropeano , Marcelo Zurita y a Lía Bouzo.

A mis amigos del alma y compañeros de la vida, Vera, Soledad, Guadalupe, Gabriel, Mauricio, Natalia, Soledad, Lorena, Mariana, Andrea, Roxana, Florencia, Ventu y Gilda, por acompañarme a cada paso y estar siempre a mi lado sin importar las distancias.

A mis amigos, Patri, Victor, Marco, Mayte, Eva, Marcos e Isa, por brindarme su cariño incondicional, estar siempre presentes y hacerme sentir como en casa en todos estos años.

A mis tíos Óscar y Julita por su entrañable presencia, dedicación, apoyo y cariño constantes .

A mi Familia por entero, desde mis abuelos, tíos, primos y primas políticas, sobrinos, ahijados, a todos ellos por brindarme el orgullo de pertenecer y la pertenencia del amor.

A mi prima Analía por la inestimable ayuda con el inglés pero principalmente por estar siempre a mi lado, a pesar de los kilómetros que nos separan.

A mis hermanos, Adolfo y Adrián, por cuidarme, quererme y acompañarme durante toda mi vida.

A Adolfo y Analía por su compañía, apoyo, paciencia y amor durante estos tres años.

A Francisco, Sofía, Santiago y Máximo, por ser los soles que iluminan mis días.

Por último, aunque ellos saben que son los primeros, a Mis Padres, por su amor y apoyo incondicionales, por creer siempre en mi y sencillamente porque todo se lo debo a ellos...

A toda la gente que no nombro en esta Tesis pero que me ayudan cada día a ser un poco mejor... a todos ustedes ...

MUCHAS GRACIAS.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una Beca Predoctoral para estudiantes iberoamericanos otorgada por la Universidade de Santiago de Compostela en cofinanciación con el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo y enmarcada dentro del Proyecto de Investigación titulado: “Estudio sobre el efecto de la suplementación de distintos niveles de cobre en cebo intensivo de terneros” (PGIDIT04RAG261005PR), financiado por la Xunta de Galicia y desarrollado en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

Indice

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
I. NECESIDADES Y FUENTES DE COBRE EN RUMIANTES	11
I.1. Fuentes de cobre	11
I.1.1. Cobre en suelos	11
I.1.2. Cobre en plantas	15
I.1.3. Factores de variación de las fuentes de cobre	17
I.2. Necesidades de cobre	21
I.2.1. Tipo de alimento	21
I.2.2. Efectos del molibdeno y azufre en la disponibilidad del cobre	22
I.2.3. La importancia de la constitución genética	22
II. METABOLISMO Y FUNCIONES DEL COBRE	23
II.1. Metabolismo	23
II.1.1. Absorción	23
II.1.2. Transporte y almacenamiento	26
II.1.3. Metabolismo hepático	27
II.1.4. Proteínas implicadas en el metabolismo del cobre	31
II.1.5. Distribución tisular de cobre	36
II.1.6. Excreción biliar	37
II.2. Funciones del cobre	38
II.2.1. Eritropoyesis	40
II.2.2. Protección frente a oxidantes	41
II.2.3. Desarrollo cardíaco	41
II.2.4. Desarrollo de los vasos sanguíneos	43
II.2.5. Desarrollo óseo	44
II.2.6. Desarrollo del Sistema Nervioso Central	44
II.2.7. Cambios en el tejido elástico	46
II.2.8. Pigmentación	46
II.2.9. Inmunocompetencia	47
II.2.10. Nuevas implicaciones del cobre en el Sistema Nervioso	48
III. ACUMULACIÓN CRÓNICA DE COBRE	51
III.1. Etiopatogenia	53
III.2. Cuadro clínico	57
III.2.1. Cambios en hígado	58
III.2.2. Cambios en sangre	59
III.2.3. Cambios en riñón	60
III.3. Acumulación subclínica de cobre en el hígado	60
IV. PARÁMETROS PARA VALORAR EL ESTATUS DE COBRE	63
IV.1. Cobre dietético y sus antagonistas	64
IV.2. Cobre en hígado	64
IV.3. Cobre en riñón	67
IV.4. Cobre plasmático y sérico	67

IV.5. Cobre sanguíneo	69
IV.6. Ceruloplasmina	69
IV.7. Cobre. Zinc. Superóxidodismutasa (SOD)	70
IV.8. Biomarcadores de acumulación hepática de cobre	71
IV.9. Enzimas marcadoras de daño hepático	71
IV.10. Hematología	72
IV.11. Cobre en pelo y lana	72
IV.12. Hallazgos de necropsia	73
V. FACTORES DE VARIACION EN LA ACUMULACION ORGANICA DE COBRE	74
V.1. Influencia de la especie sobre la acumulación orgánica de cobre	74
V.2. Influencia de la raza sobre la acumulación orgánica de cobre	75
V.2.1. Ganado ovino	75
V.2.2. Ganado bovino	77
V.3. Influencia del sexo sobre la acumulación orgánica de cobre	80
V.4. Influencia de la edad sobre la acumulación orgánica de cobre	81
V.5. Influencia de la época del año sobre la acumulación orgánica de cobre	82
V.6. Interacciones del cobre con otros metales	82
V.6.1. Interacciones del cobre con elementos tóxicos	83
V.6.2. Interacción del cobre con otros elementos esenciales	85
V.7. Influencia hormonal en el metabolismo del cobre	91
V.7.1. Hormona del crecimiento	92
V.7.2. Hormona adrenocorticotropica y adrenales	92
V.7.3. Hormonas sexuales	93
VI. TRATAMIENTO Y CONTROL, SUPLEMENTACION DE COBRE	94
VI.1. Tratamiento y control	94
VI.2. Suplementación de cobre	96
VI.2.1. Suplementación de cobre en los suelos	97
VI.2.2. Suplementación de cobre en la dieta	98
VI.2.3. Suplementación de cobre en el agua de bebida	100
VI.2.4. Suplementación parenteral	101
VI.2.5. Agujas de óxido de cobre	102
VI.2.6. Liberación controlada de cristales	104
VI.2.7. Suplementos de cobre inorgánicos vs. Orgánicos	104
VI.2.8. Selección genética	105
VI.2.9. Minimización de los antagonismos	105
MATERIAL Y MÉTODOS	107
I. Animales de estudio y diseño experimental	109
I.1. Selección de los animales de estudio y condiciones de experimentación	109
I.2. Características de la dieta	110
I.3. Parámetros productivos	112
II. Toma de muestras	113
II.1. Sangre	113
II.2. Biopsias hepáticas	114
II.3. Toma de muestras de tejido postmortem	116
III. Determinaciones analíticas	119
III.1. Hematología	119
III.2. Bioquímica	119
III.3. Determinación de los niveles de ceruloplasmina	124
III.4. Determinación de los niveles de cobre y zinc por espectroscopia de emisión con fuente de plasma pcoplado (ICP-OES)	125
III.5. Determinación de los niveles de metalotioneínas	128
IV. Análisis estadístico	132

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
Capítulo I. Evaluación de los niveles de cobre en sangre durante el ciclo productivo.	137
Capítulo II. Evaluación de los niveles de cobre en tejidos postmortem	153
Capítulo III. Distribución de cobre en hígado en función de la región anatómica	165
Capítulo IV. Distribución subcelular de cobre: fraccionamiento subcelular y concentración de metalotioneínas.	179
Capítulo V. Evaluación de parámetros hematológicos y bioquímicos.	199
CONCLUSIONES/CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	213
RESUMEN/RIASSUNTO/SUMMARY/RESUMO	221
BIBLIOGRAFÍA	239

Introducción y objetivos

Los elementos minerales son compuestos esenciales para la vida de los animales cuya función es salvaguardar la integridad funcional y estructural de los tejidos y mantener inalterado el crecimiento, la salud y la productividad de los mismos. Dentro de este grupo encontramos al cobre, importante cofactor de numerosas enzimas y procesos metabólicos entre los que se incluyen la fosforilación oxidativa, el transporte de oxígeno y la detoxificación de radicales libres. Sin embargo, dentro del equilibrado funcionamiento del organismo animal, la concentración excesiva de este metal, al igual que otros elementos no esenciales como el cadmio, plomo o arsénico, puede llevar a los animales a un estado de intoxicación (Horn y Tümer, 1999; Mercer, 2001). Es por esto que a lo largo del proceso evolutivo, los organismos vivos han desarrollado mecanismos homeostáticos altamente especializados para secuestrar, almacenar y excretar cobre, así como eficientes mecanismos detoxificadores para contrarrestar sus posibles efectos deletéreos cuando está presente en concentraciones excesivas.

Ante la prevalencia de trastornos metabólicos en los animales por carencias o excesos de cobre, su metabolismo fue estudiado en profundidad desde hace muchos años y a día de hoy se sigue avanzando al respecto, pudiendo enumerar los últimos hallazgos de proteínas implicadas en su metabolismo como las metalotioneínas, chaperones y Cu-ATPasas, el conocimiento de su función como base molecular en importantes enfermedades hereditarias en la especie humana (Enfermedad de Menkes y Enfermedad de Wilson) hasta llegar a su reciente implicación en procesos neurológicos de relevancia como la encefalopatía espongiiforme bovina (Mercer, 2001; Bounias y Purdey, 2002; Hanlon et al., 2002). Sin embargo, a pesar de todos estos avances no se conocen en detalle los mecanismos homeostáticos que regulan el metabolismo de cobre a nivel celular (Dameron y Harrison, 1998; Harrison y Dameron, 1999; Horn y Tümer, 1999; Harris, 2000, 2001; Mercer, 2001).

Es sabido que dentro de las especies animales, y específicamente entre los animales domésticos, existen importantes diferencias en su susceptibilidad a padecer procesos de intoxicación por cobre (Bremner, 1998; Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002). A lo largo de los años se llegó a la conclusión que los rumiantes son los más susceptibles al compararlos, por ejemplo, con el ganado porcino que es

altamente tolerante a niveles elevados de cobre en la dieta, hecho que se manifiesta en su suplementación (junto con zinc) como promotor de crecimiento a altas concentraciones (250 mg Cu/kg materia seca) en los sistemas de producción intensiva (Poulsen, 1998). Adentrándonos en la familia de rumiantes, se descubrió, que el ganado ovino era particularmente susceptible a la intoxicación por cobre, probablemente por su incapacidad de incrementar la excreción biliar de cobre en respuesta a niveles altos en su dieta ; y sin embargo, durante muchos años se consideró al ganado vacuno como una especie resistente ya que los episodios de toxicidad eran poco frecuentes. Es por esto que no se incluía a la intoxicación por cobre dentro de los paneles de diagnóstico diferencial de otras enfermedades en esta especie.

No obstante, esta realidad cambió y en los últimos años el número de casos de intoxicación por cobre en ganado vacuno se incrementó de forma drástica (Bradley, 1993; Engle y Spears, 2000a), incluso con niveles de acumulación hepática claramente inferiores a los considerados como tóxicos de forma clásica (Perrin et al., 1990; Gummow, 1996). Esta alarma dió origen a nuevas investigaciones que no han llegado a demostrar que la causa principal sea una concentración excesiva de cobre en la dieta y tampoco se ha llegado a identificar un alimento o grupo de ellos como causa fundamental en este tipo de intoxicaciones. Se piensa, sin embargo, que muchos casos podrían estar asociados a un cambio en el tipo y disponibilidad de los suplementos de cobre empleados (Galey et al., 1991; Steffen et al., 1997). Así, se observó, que determinados suplementos, donde el mecanismo de acción de los aminoácidos es quelar minerales, aumentan la disponibilidad de los mismos en un 300-500% en comparación con las tradicionales sales de sulfato de cobre, generando en muchos de los casos, episodios de toxicidad relacionados directamente a estos cambios en los suplementos dietéticos empleados (Galey et al., 1991; Steffen et al., 1997).

Estudios recientes en animales suplementados con cobre, dentro de los límites permitidos, ponen de manifiesto que se alcanzan niveles de residuo en hígado de alrededor de 125 mg Cu/kg, los que se encuentran claramente por encima de los valores de normalidad (25-100 mg/kg; Puls, 1994) y que en algunos casos los animales mostraban un menor consumo de alimento y ganancia de peso en comparación con los animales control (Engle and Spears, 2000a). Estos niveles de cobre que parecen estar asociados a toxicidad subclínica en terneros han sido descritos a gran escala en numerosos países, estando asociados en la mayor parte de los casos al uso de suplementos minerales por encima de las necesidades animales (Hadrich, 1996; Jilg et al., 1997) o a la contaminación de pastos o forrajes por emisiones industriales, mineras o lodos, especialmente purines de cerdo ricos en cobre (Tokarnia et al., 2000; López-Alonso et al., 2001).

A la hora de estudiar el metabolismo y acumulación de cobre en animales, y especialmente en rumiantes, es importante señalar que el desarrollo de problemas de deficiencia y toxicidad no va a depender solo de la concentración de cobre en la dieta, sino que va a verse afectado por numerosos factores que condicionan tanto la absorción/excreción como la biodisponibilidad del mismo (Gooneratne et al., 1989a). Entre estos factores, el estatus de otros elementos en la dieta, principalmente el molibdeno y el azufre, aunque también el zinc y hierro, van a ser fundamentales para estimar los requerimientos nutricionales de cobre. Así, a modo de ejemplo, podemos señalar que pequeños cambios en la concentración de molibdeno y azufre en el pasto o en la ración pueden ser capaces de producir cambios mayores en la absorción, distribución o excreción de cobre en los rumiantes, dando como resultado síndromes clínicos tanto de deficiencia como de toxicidad (Suttle, 1991; Smith y White, 1997).

Además de los factores propios de la dieta, la susceptibilidad a padecer desordenes en el metabolismo del cobre va a depender enormemente de factores propios del animal. En este sentido, uno de los factores que emergen cuando se aborda el tema del metabolismo y la suplementación de cobre en animales de granja es que pueden existir diferencias raciales importantes, tanto en las necesidades nutricionales como en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia y/o intoxicación, hecho que debería conocerse en detalle para evitar problemas tanto de carencias como de excesos.

La importancia del componente racial en el metabolismo del cobre está bien estudiada en ganado ovino, donde existen marcadas diferencias genéticas en cuanto a la eficacia de absorción gastrointestinal del cobre dietético y a la excreción biliar. Esto ha permitido clasificar a las razas ovinas en susceptibles o resistentes a la intoxicación por cobre, y de esta forma, no solo ajustar los suplementos a los requerimientos reales de los animales sino la posibilidad de realizar una selección racial específica según las características de cada región geográfica (Underwood y Suttle, 2002). De esta manera se logró, en zonas con conocida carencia de cobre, utilizar aquellas razas con mayor capacidad de retención de cobre (como la raza Texel), disminuyendo así la incidencia de patologías deficitarias; de forma paralela en zonas con riesgo de toxicidad se utilizaron razas consideradas *resistentes* al presentar una menor acumulación de cobre hepático o una temprana saturación de la absorción de cobre como la raza Blackface, permitiendo disminuir los riesgos. La existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas de cobre ha quedado demostrada al seleccionar líneas genéticas con altos y bajos niveles de cobre (incluso en una misma raza). Según Radostits et al. (2002), la herencia genética podría explicar un 0,3% de la variación normal de este parámetro.

En ganado vacuno, sin embargo, la importancia del componente racial en el metabolismo del cobre apenas se ha estudiado. Aunque se sabe que razas como la Simmental o la Charolesa presentan mayores necesidades que otras como la Angus (Radostits et al., 2002), poco se conoce sobre la posible susceptibilidad a la intoxicación por cobre en estas y otras razas de ganado vacuno. Se ha propuesto, al igual que en el ovino, que las diferencias raciales en el metabolismo del cobre y por lo tanto en los requerimientos de los animales, podrían deberse principalmente a diferencias en la absorción del mineral a nivel intestinal, así como a la excreción biliar del mismo. Esto fue avalado por estudios que demostraron, por ejemplo, que la excreción biliar en la raza Simmental fue el doble que en la raza Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta, lo que predispone a la raza Simmental a sufrir procesos de deficiencia si las condiciones ambientales no son las óptimas (Gooneratne et al. 1994). También se hallaron diferencias genéticas en las concentraciones de cobre hepático dentro del ganado lechero, donde la raza Jersey mostró mayor susceptibilidad a la intoxicación por cobre al acumular mayor cantidad del mismo en hígado comparado con la raza Holstein frente a igual contenido de cobre en la dieta (Dú et al. 1996). Esto mismo fue observado para el ganado Limousin por Grings et al. (1999), llevando a considerar a esta raza como eficazmente adaptable a ambientes donde el cobre sea limitante.

Todos estos hallazgos, si bien permiten realizar un manejo más eficaz de los animales según sus características raciales empós de evitar alteraciones metabólicas, no lograron identificar los verdaderos puntos críticos dentro del metabolismo de cobre entre las distintas razas. Tan solo podemos considerar que las diferencias genéticas entre las razas bovinas se centrarían en la variabilidad en la absorción de cobre de la dieta, la excreción de cobre endógeno, la cantidad de alimento consumido y su capacidad de excretar los excesos de cobre (vía biliar).

En Galicia, en un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en terneros en régimen de explotación tradicional en la Comarca del Deza, en el que los animales estaban expuestos de forma natural a niveles relativamente altos de cobre en los pastos abonados con purines de cerdo ricos en cobre, se constató que existen diferencias raciales en la acumulación de cobre a nivel hepático, donde los animales de raza Frisona acumulan niveles de cobre un 50% superiores a los de raza Rubia Gallega. El hecho de que los cruces industriales entre ambas razas suelen mantener un estatus de cobre intermedio entre las mismas, apunta a la posibilidad de que este acúmulo tenga un componente genético-racial importante y pone de manifiesto la mayor susceptibilidad del ganado de raza Frisona a sufrir procesos crónicos de acumulación de cobre a nivel hepático (Cruz, 2005; Miranda et al., 2006). Este hecho podría tener relevancia, además de en aquellos animales expuestos de forma natural a contaminantes en el medio ambiente (como es la Comarca del Deza), en sistemas

de explotación intensivos donde las dietas de vacuno se suplementan de forma rutinaria con niveles relativamente altos de cobre.

No debemos dejar de tener en cuenta, sin embargo, que muchas veces la suplementación puede ser la adecuada para los animales, pero ante situaciones estresantes o de interacciones con otros oligoelementos en la dieta, se genera una situación de desequilibrio que dispara los signos de deficiencia o intoxicación, y en estos casos serán mas susceptibles aquellas razas que acumulan mayor cantidad de cobre hepático en condiciones normales (Galey et al. 1991; Tremblay y Baird, 1991; Bradley, 1993.)

El objetivo general que nos planteamos en esta Tesis Doctoral es evaluar de forma experimental la influencia de la raza (Frisona, Rubia Gallega y cruces industriales de ambas razas) sobre el metabolismo y la acumulación intrahepática de cobre en terneros mantenidos en régimen intensivo y con el nivel de suplementación permitido por la Unión Europea (35 mg/kg materia seca; Reglamento CE Nº 1334/2003 da Comisión de 25 de julio de 2003). Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Evaluar el efecto de la raza sobre diversos parámetros sanguíneos de cobre durante todo el ciclo productivo en terneros
2. Estudiar si existen diferencias raciales en la distribución y acumulación orgánica (hígado, riñón, músculo, corazón, bazo y cerebro) de cobre en el momento del sacrificio.
3. Determinar si existen diferencias raciales sobre la distribución del cobre en distintas regiones anatómicas del hígado, así como la validez de la biopsia hepática in vivo para determinar la acumulación intrahepática de cobre.
4. Valorar la influencia de la raza en la distribución subcelular de cobre en hígado (fraccionamiento subcelular y concentración de metalotioneínas) que puedan condicionar la susceptibilidad de los animales a sufrir procesos de acumulación crónica.
5. Evaluar las repercusiones orgánicas de la acumulación de cobre, a través de parámetros hematológicos y bioquímicos, en las distintas razas.

I. Necesidades y fuentes de cobre en rumiantes

Para poder establecer las necesidades dietéticas de cobre, al igual que otros nutrientes o minerales, es necesario previamente tener conocimiento de cuáles son las principales fuentes del nutriente, y conocer los niveles en suelos y plantas, así como los factores que pueden influenciar la disponibilidad de los mismos.

I.1. Fuentes de cobre

I.1.1. Cobre en suelos

Los niveles de cobre en suelos varían de 6 a 60 mg/kg (Kabata-Pendias, 2001). La concentración inicial de cobre en los suelos depende fundamentalmente de dos factores, la roca madre y los procesos de formación del mismo; así, por ejemplo, el contenido de cobre suele ser más alto en suelos ricos en hierro y más bajo en suelos arenosos y orgánicos.

El cobre es el mineral más abundante en las rocas *mafic* e intermedias de la corteza terrestre, mientras que en las rocas eruptivas, como los granitos, se encuentra en concentraciones muy bajas. Se suele presentar bajo formas simples y complejos sulfato; estos minerales se solubilizan fácilmente en procesos intemporales y liberan los iones de cobre sobre todo en ambientes ácidos. El cobre es un catión versátil que en los suelos o en la materia reposicionada cuenta con una gran capacidad para interaccionar químicamente con otros minerales y compuestos orgánicos. Aunque es soluble, y por tanto móvil y disponible, la forma química en la que se presenta en el suelo es de gran importancia para las prácticas agrícolas, mientras que el contenido total de cobre ofrece únicamente información básica para los estudios geoquímicos.

La característica más común en la distribución del cobre en cuanto al perfil del suelo es su acumulación en el horizonte (capas superficiales). Esto hace que la determinación de la concentración del cobre en la superficie de los suelos refleje la bioacumulación del metal y las deposiciones recientes provocadas por el manejo del hombre.

La variación del pH afecta a la asimilación del cobre, aunque se mantiene al mismo nivel cuando el pH baja de 5. Si se eleva el pH se reduce el cobre asimilado, lo que

hace que las carencias de cobre se observen con más frecuencia en los suelos calizos (Kabata-Pendias, 2001).

I.1.1.1. Reacciones con los componentes del suelo

Los procesos que implican la fijación del cobre por el suelo se relacionan con los siguientes fenómenos:

- **Adsorción.** Todos los suelos son capaces de absorber iones de cobre de la fase en la que están disueltos y sus propiedades dependen de la carga superficial de los adsorbentes. La carga superficial está controlada por el pH, por tanto la adsorción de las especies iónicas se puede presentar como una función del mismo. La adsorción del cobre en general es muy elevada, lo que limita su movilidad y hace que sea uno de los 6 microelementos que es adsorbido con mayor fuerza por la superficie de cambio de suelo, explicando así la tendencia a formar enlaces muy enérgicos. Muchos autores constataron que el cobre puede ser absorbido dentro de un rango de 1.90-63.5 mg/g; de esa cantidad absorbida el cobre ha sido siempre encontrado con óxido de hierro y manganeso, hierro amorfo (formas cristalinas), hidróxido de aluminio y arcilla. Harter (1979) demostró que las cifras más significativas en la superficie del suelo se obtuvieron entre absorción de cobre y el total de bases, mientras que en profundidad la absorción de cobre está altamente relacionada con el contenido de vermiculita.
- **Oclusión, coprecipitación y sustitución.** Son fenómenos involucrados en la adsorción inespecífica de cobre. Aquellas fracciones del cobre en el suelo que no se difunden son las que están formando parte de ciertas estructuras minerales que tienen una enorme afinidad por ellas, constituyendo la porción más estable del metal en el suelo.
- **Quelación orgánica y formación de complejos.** La capacidad de los constituyentes orgánicos del suelo para unirse al cobre está reconocida, siendo estas reacciones la llave que gobierna el comportamiento del cobre en la mayoría de los suelos.
- **Fijación microbiana.** Juega un rol muy importante en la unión al cobre en determinadas superficies del suelo. La cantidad de cobre fijada por la biomasa microbiana varía ampliamente y se ve afectada por varios factores como la concentración del metal, las propiedades del suelo y el crecimiento estacional, siendo sin duda un importante paso en el ciclo ecológico de este metal.

I.1.1.2. Contaminación del suelo

La contaminación del suelo agrícola por cobre se debe fundamentalmente a la utilización de purines de cerdo (y en menor medida de gallinaza) como fertilizantes, así como al empleo de fitosanitarios, aerosoles y otros productos con un contenido elevado de este metal (García Fernández et al., 1999). En zonas industriales, las emisiones procedentes de actividades antropogénicas pueden contribuir además de forma significativa al enriquecimiento de cobre de los suelos (Grobler, 1999; Grobler y Swan, 1999 a, b; Underwood y Suttle, 2002).

Los purines de cerdo contienen elevadas concentraciones de cobre y zinc. Esto se deb a la adición de cobre en las dietas para cerdos como promotor de crecimiento así como para el control de la disentería; simultáneamente se añade zinc para prevenir cuadros de intoxicación por cobre y problemas de paraqueratosis y/o deficiencia de zinc (Christie y Beattie, 1989). El problema deriva en que no se ajustan las cantidades de estos oligoelementos en la dieta a los requerimientos del animal en función de su estado productivo. Si las concentraciones de estos minerales son superiores a los niveles de absorción, que es lo habitual, la parte no absorbida pasa a los purines o estiércol aumentando su poder contaminante (Coppenet et al., 1993; Vilafranca, 1997; Poulsen, 1998).

El purín de cerdo está considerado como uno de los problemas medioambientales más importantes en los países con elevada densidad de porcino en intensivo, como Francia (Arzul y Maguer, 1990; Copenet et al., 1993; L'Herroux et al., 1997), Dinamarca (Bak et al., 1997), Holanda (Binnerts, 1986; Esselink et al., 1995) e incluso Reino Unido (Parkinson y Yells, 1985; Christie y Beattie, 1989; Poole et al., 1990; Nicholson et al., 1999), donde se ha demostrado que el uso de estos purines como fertilizante en los campos provoca un incremento anual importante de cobre en los suelos, llegando incluso a alcanzar niveles de toxicidad si el uso de estos purines es elevado (Carballás Fernández et al., 1990).

El abonado continuo de los campos con purines de cerdo produce acúmulos considerables de cobre y zinc, que pueden llegar a producir efectos detectables en la biomasa microbiana del suelo e incluso pueden ser tóxicos para los animales, sobre todo la oveja (Christie y Beattie, 1989). Coppenet et al. (1993) observaron como con los años el acúmulo tanto de cobre como de zinc en los suelos aumenta de manera preocupante. Arzul y Maguer (1990) observaron una correlación positiva entre el número de cerdos por hectárea y el nivel de cobre en los estuarios, señalando además que los niveles de cobre en suelos crecían proporcionalmente con la carga porcina. Posteriormente, L'Herroux et al. (1997) en esta misma zona, estudiaron los metales pesados presentes en los purines de cerdo y observaron que al inicio del experimento el cobre en el suelo estaba de forma inerte (fracción residual) y en formas químicas poco asimilables por las plantas. Tras aplicaciones intensivas de

purines este elemento estaba presente en concentraciones mucho mayores y en formas disponibles, debido a que la reincidencia de abonado produjo cambios de las condiciones ambientales con alteraciones del potencial redox, bajada del pH y condiciones de anoxia o anaerobiosis. Existe por tanto la necesidad de evaluar las condiciones locales y el tipo de suelo en particular antes de proceder a la aplicación de los purines en los campos. Además, debe tenerse en cuenta las características y los niveles de cobre en la hierba y los excesos de este mineral disponibles para el ganado (Parkinson y Yells, 1985).

Numerosos autores han descrito en ganado ovino niveles elevados de cobre en hígado en animales que se alimentan de forraje sobre el que se aplican estos purines, siendo frecuentes los casos de intoxicación (Parkinson y Yells, 1985; Christie y Beattie, 1989; Poole et al., 1990; Kerr y McGavin, 1991). Aunque con menor frecuencia, también se han descrito casos de toxicidad en ganado vacuno (Batey et al., 1972; Braude, 1973), atribuidos al consumo de pastos a los que se había aplicado purines de cerdo.

La gestión y tratamiento del estiércol y de los purines en las explotaciones de porcino es un aspecto que cada vez adquiere mayor importancia debido a la sensibilidad social y al problema de acúmulo de determinados elementos tóxicos en suelo-planta-animales por el abuso de abonado (De la Torre et al., 2000). Además, la legislación será más restrictiva en el futuro debido a que las dimensiones de las explotaciones han aumentado considerablemente, produciéndose una concentración de la cabaña porcina en determinadas áreas, lo que origina un aumento final de la carga animal y lleva por tanto a problemas para la reutilización del estiércol y purines de la propia explotación, con el peligro de originar situaciones de riesgo para la salud humana y animal (Vilafranca, 1997).

Aunque en menor medida, debemos señalar el potencial contaminante del empleo de gallinaza como fertilizante agrícola. A los pollos de crecimiento acelerado se le aportan, al igual que a los cerdos, excesos de minerales como promotores de crecimiento así como para evitar ciertas enfermedades. Por ello, los excrementos de pollo son también una importante fuente de contaminación por acúmulo excesivo de determinados minerales (cobre, zinc y manganeso principalmente) en el suelo y plantas, por lo que debe controlarse el uso continuo de los mismos en los campos para evitar problemas en los pastos y en los animales que se alimentan de ellos (Van der Watt et al., 1994).

De forma más puntual, o incluso accidental, la contaminación de cobre en el suelo podría presentarse por la corrosión de materiales de construcción con aleación de cobre como son los alambres eléctricos o las cañerías, entre otros (Kabata-Pendias, 2001).

I.1.2. Cobre en plantas

I.1.2.1. Absorción y transporte

Los mecanismos de absorción del cobre por las plantas no se conocen en detalle, aunque hay evidencias de que se trata de un proceso de absorción activa; no obstante, cuando se alcanzan niveles de toxicidad de cobre en los suelos pueden ocurrir fenómenos de absorción pasiva.

A pesar de la complejidad de los mecanismos de absorción, se observa una correlación entre la concentración del metal en las soluciones nutrientes o en el suelo y la concentración en las plantas, siendo dicha asociación especialmente evidente en el rango de toxicidad (Cook et al., 1997; Kabata-Pendias, 2001). Además, debemos señalar que el contenido de cobre de las plantas que crecen en zonas irrigadas se va a ver condicionado no sólo por factores dependientes del suelo sino también por los niveles de cobre en el agua y demás propiedades de la misma.

La distribución del cobre dentro de la planta es altamente variable siendo la tendencia general a acumularse en los órganos reproductivos de la planta; así, la mayor concentración de cobre ha sido encontrada en el embrión de los granos de cereales (con un rango de 8 a 18 mg/kg materia seca) y en la cubierta de la semilla (de 8 a 23 mg/kg), mientras que considerando el total de la misma el valor mayor registrado fue 4 mg/kg (Loneragan, 1981).

El movimiento del cobre en la planta determina su utilización por la misma. Así, los tejidos que se encuentran en las raíces poseen la enorme capacidad de unirse al cobre a contragradiente de su transporte hacia los brotes, tanto bajo condiciones de deficiencia como de exceso de cobre. Aunque este proceso todavía no se conoce de forma completa, Loneragan (1981) concluyó con sus estudios que la excreción del cobre desde la raíz hacia el xilema y el floema donde se encuentran las formas móviles del cobre, constituye la base de la nutrición referida al cobre en las plantas.

La extracción de cobre por los cultivos es despreciable en comparación con el contenido en el suelo (Cabral et al., 1998; Kabata-Pendias, 2001). A pesar de la tolerancia general de las plantas (especies y genotipos) este metal se considera altamente tóxico (Oskarsson y Norrgren, 1998). Los síntomas generales más característicos de la intoxicación por cobre son clorosis y malformación en las raíces; además, el crecimiento se reduce, sobre todo el de las raíces que son espesas, poco ramificadas y con raicillas de color oscuro (Loué, 1988). Estudios en trigo en crecimiento en suelos enriquecidos en cobre mostraron que las plantas reducían su crecimiento, sufrían clorosis y cambios ultraestructurales en los cloroplastos y manifestaban una eficiencia reducida de la fotoquímica del fotosistema II (PSII) (Eleftheriou y Karataglis, 1989). De todas formas, la toxicidad del cobre no es frecuente debido a la gran capacidad de fijación de este elemento en el suelo, y

únicamente aquellos suelos muy ricos en cobre (por el contenido de la roca madre o bien por aportes de cobre durante mucho tiempo) suelen presentar un riesgo potencial para las plantas (Loué, 1988). Para valorar el riesgo de toxicidad se consideran dos criterios principales que son la cantidad de hierro cambiante y el pH bajo (Loué, 1988).

I.1.2.2. Funciones bioquímicas

El cobre presenta un papel muy importante en diversos procesos fisiológicos de la planta como son la fotosíntesis, la respiración, la distribución de carbohidratos, la reducción y fijación del nitrógeno y el metabolismo proteico; también influye en la permeabilidad de los vasos del xilema, la síntesis de DNA y RNA y su deficiencia inhibe la reproducción de la planta, disminuyendo la producción de semillas y polen; además el cobre está involucrado en los mecanismos de resistencia a determinadas enfermedades (Kabata-Pendias, 2001).

Debido a la implicación del cobre en gran número de procesos fisiológicos, la deficiencia del mismo afecta de forma muy importante a la producción de las plantas. Se han aplicado distintos métodos para la valoración de estos efectos, como son el uso de plantas indicadoras, de test en suelos o ensayos bioquímicos. No obstante, aunque la deficiencia de cobre es frecuente y bien conocida, el diagnóstico y corrección de la misma necesita estudiarse con más profundidad. Sin embargo, se podría generalizar que concentraciones inferiores a 2 mg/kg serían inadecuadas para el desarrollo apropiado de la mayoría de las plantas (Kabata-Pendias, 2001).

I.1.2.3. Interacciones con otros elementos

Para un desarrollo óptimo, la planta debe tener no sólo una cantidad apropiada de cobre activo en las células sino también poseer un equilibrio entre los elementos químicos. Debido a la función significativa del cobre en los enzimas y su valencia variable, iones que tienen similar afinidad a las proteínas a las que se une el cobre van a dar lugar a antagonismos.

El arsénico, cobre y níquel son elementos que presentan una gran toxicidad para las plantas. A modo de ejemplo, en un estudio sobre las 2 o 3 vías de interacción que afectan al crecimiento y composición tisular del arroz (*Oryza sativa* L.) se constató que según los rangos de aplicación de los niveles de metales los efectos de níquel, cobre y arsénico no eran independientes unos de otros. En términos de toxicidad, existe una interacción sinérgica entre cobre y níquel, mientras que entre níquel y arsénico, cobre y arsénico se observaron antagonismos (Kabata-Pendias, 2001).

I.1.3. Factores de variación de las fuentes de cobre

I.1.3.1. Disponibilidad en los alimentos

Los ingredientes naturales de las raciones para animales domésticos son con frecuencia deficientes en varios microminerales, lo que hace necesaria su suplementación externa. Por este motivo es importante conocer las necesidades del animal así como la disponibilidad de los micronutrientes, tanto de las materias primas del pienso como de las fuentes externas utilizadas.

La *disponibilidad* de un micromineral se define como el porcentaje del mismo que es utilizado por el animal. En términos económicos, debemos tener en cuenta que es difícil determinar la disponibilidad real de los microminerales con fiabilidad. Numerosos factores, tales como la metodología del ensayo, el animal, las características de la dieta y las interacciones entre minerales influyen en los valores obtenidos. Además, la disponibilidad se valora en comparación con un patrón, que no siempre es el mismo en los distintos laboratorios (FEDNA, 1999).

Nederbragt et al. (1984) indican que la disponibilidad de cobre en rumiantes depende de la valencia del cobre en la ingesta y está condicionada por las variaciones en la microflora del rumen. Muchos otros factores como la raza, la edad, la composición del suelo y de la ración, así como las variaciones que determinan el cobre disponible para la absorción intestinal también pueden influir en la disponibilidad final del mismo.

I.1.3.1.1. Factores dependientes del suelo

Como ya hemos indicado, existe una amplia variedad geográfica en el contenido de cobre en los suelos, el cual se refleja en la incidencia natural de la deficiencia de cobre en los animales.

Aunque se observaron bajos contenidos de cobre disponible en las plantas en aquellos suelos ricos en materia orgánica (Haynes, 1997), las deficiencias de cobre casi en su totalidad se presentan dependientes de factores dietéticos que interfieren sobre la absorción y utilización del cobre por el animal (Phillippo, 1983). Así por ejemplo, se observó una deficiencia leve de cobre en ganado vacuno en zonas de Inglaterra en época de primavera con una contaminación anterior del suelo por hierro (Underwood y Suttle, 2002).

En diversas zonas se ha visto como la hierba capta suficiente molibdeno como para inducir problemas clínicos de deficiencia de cobre, lo que nos lleva a presentar el estatus del molibdeno en el suelo como el factor más influyente del que dependen los niveles de cobre. El fuerte efecto influyente del molibdeno hace necesario el diseño de mapas que señalen su contenido en los suelos y sedimentos de arrastre,

pudiendo así delimitarse las áreas de mayor riesgo de hipocuprosis para los animales (Boila et al., 1984).

I.1.3.1.2. Factores vegetales

Se ha estudiado el efecto de una serie de factores sobre el estatus de cobre en las plantas, entre ellos, las diferencias ambientales entre la estabulación y pasto, hierba fresca y heno o el estado de crecimiento de la hierba fresca.

Entre la hierba fresca y la ración de invierno no existen diferencias en cuanto a la composición mineral, de hecho se observó un estatus de cobre más adecuado en el hígado de vacas estabuladas al final del periodo invernal (con una alimentación a base de más heno y menos silo) que en otras granjas en la época de primavera (Loué, 1988).

La estabulación no afecta de forma significativa al estatus de cobre de los animales, aunque éste sí se ve mejorado con una alimentación a base heno en comparación a hierba fresca; esto es debido no sólo al proceso de henificación sino también a la diferencia de la fase de crecimiento en la que se encuentra la planta en el momento del procesado. Incluso se ha visto que en ganado vacuno los animales estabulados alimentados a base de heno incrementan su estatus de cobre (Branion, 1960).

En estudios bioquímicos en ganado vacuno en los que se consideró el nivel de cobre en hierba fresca y heno, así como en el contenido ruminal y heces, se puso de manifiesto la capacidad de formar complejos sulfito en el rumen, lo cual resulta ser un mecanismo muy importante para disminuir la disponibilidad del cobre en rumiantes (Underwood y Suttle, 2002).

I.1.3.1.3. Factores estacionales

Los factores estacionales presentan un interés particular ya que los antagonistas del cobre se ven afectados de forma muy importante por ellos. Así, el hierro se encuentra en sus máximos niveles en primavera y otoño; las concentraciones de molibdeno aumentan gradualmente con el avance del año aunque pueden aumentar de forma marcada en la primavera (Korte et al., 1996) llegando incluso a duplicarse durante la estación de pastoreo (Suttle et al., 1999). La concentración de azufre descende con la maduración de la planta mientras que la disponibilidad del cobre aumenta. Todos estos factores hacen que existan importantes variaciones en el estatus del cobre en animales entre la primavera y el otoño, especialmente en los casos de deficiencia de cobre descritos en animales en crecimiento. Así, se han registrado fluctuaciones estacionales en los niveles plasmáticos de cobre, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas en agosto y septiembre (Smart, 1984).

I.1.3.1.4. Factores nutricionales

En función del cobre disponible se cubrirán las necesidades e incluso se incrementará el riesgo de intoxicación mucho más que por la concentración de cobre total contenida en el alimento.

A pesar de los importantes estudios sobre forrajes llevados a cabo por Mills (1954,1956) hay que destacar que poco se conoce sobre las formas en que se presenta el cobre en los alimentos. Debemos considerar que las variaciones en los valores de disponibilidad del cobre para rumiantes de un mismo ingrediente o entre ellos dependen de lo que ocurra en el rumen, y en particular de la sincronía entre la liberación de cobre y de sus antagonistas potenciales, principalmente molibdeno, azufre e hierro.

Debe tenerse en cuenta que existen diferencias entre la materia prima y el producto final, pudiendo los procesados aumentar o disminuir su contenido de cobre. No obstante, poco se conoce sobre la naturaleza del cobre en los productos alimenticios y los efectos del procesado son difíciles de valorar. El metal podría formar complejos con moléculas orgánicas que liberan cobre sólo después de sufrir condiciones extremas de desnaturalización. En contraste con estas observaciones, Mills (1954, 1956) demostró que la hierba fresca es altamente efectiva para aumentar los almacenes de cobre en animales con deficiencia. Bremner (1970) realizó varios experimentos para caracterizar las especies que eran metal afines en el tracto gastrointestinal de animales con una dieta de hierba seca.

I.1.3.1.5. Otros factores

La disponibilidad del cobre puede además estar condicionada por otros factores como la ingesta, fase de preñez o las concentraciones hepáticas.

La fase de preñez afecta a la cinética tanto del feto como de la madre. Así, durante el primer trimestre la concentración hepática de cobre fetal está entorno a 200 mg/kg de materia seca, independientemente de la edad de la madre, raza y estatus de cobre (Crow et al., 1980). Smart y Christensen (1982) encontraron que el contenido hepático descendía repentinamente después de 180 días de gestación en los fetos de vacas que mostraban deficiencia de cobre en hígado (<30 mg/kg materia seca). Aunque no se ve afectado por el estatus de cobre de la madre, la ingesta de cobre durante la gestación modifica los niveles hepáticos del ternero neonato, por lo que debe tenerse mucho cuidado ya que no se han determinado los niveles que provocan toxicidad en los terneros. En los recién nacidos la regulación homeostática de cobre es deficiente ya que van a tener un sistema homeostático muy simple. El sistema de la ceruloplasmina no madura antes de los 4 días tras el nacimiento, en este momento el cobre es liberado del hígado y se alcanzan en plasma los valores de referencia en adultos; estos aumentos que se dan tras el nacimiento son

independientes de la madre o de las concentraciones de cobre en el hígado de los terneros.

I.1.3.2. Composición de los forrajes

La especie, la variedad y la madurez de la planta así como las condiciones del suelo y los fertilizantes utilizados influyen en los contenidos de cobre y de otros minerales íntimamente relacionados en su metabolismo como hierro, molibdeno y azufre (McFarlane et al., 1990). Así, las concentraciones excesivamente altas de molibdeno en los forrajes se dan de forma natural en suelos alcalinos y suelos ricos en materia orgánica, que además cuentan con niveles elevados de azufre en los forrajes.

Las gramíneas tienden a ser más pobres en cobre que las leguminosas (4,7 versus 7,8 Cu mg/kg materia seca). En gramíneas de clima templado el cobre no se distribuye de forma homogénea (las hojas presentan un mayor contenido que los tallos) de manera que las concentraciones de cobre tienden a disminuir durante la estación de crecimiento (Minson, 1990).

Cuando el contenido de cobre de los forrajes y de los pastos es de 1 a 3 mg/kg materia seca, las enfermedades carenciales en los animales son muy probables (Loué, 1988).

I.1.3.3. Composición de los alimentos concentrados

El contenido en cobre de las materias primas varía entre 5 y 20 mg/kg materia seca. La disponibilidad del cobre es muy variable si bien, en general, es inferior en fuentes vegetales que en fuentes animales o inorgánicas, probablemente debido a que en las primeras se encuentra en forma de fitatos. La disponibilidad de cobre es además superior en henos que en praderas, especialmente cuando se pastan previo a la floración.

La mayoría de las fuentes minerales de cobre (metionato, lisinato, sulfato, acetato, cloruro, óxido cuproso, etc.) son bien utilizadas tanto en monogástricos como en rumiantes. Tomando como referencia el cobre pentahidratado (asignándole una disponibilidad del 100%) el carbonato presenta valores medios, inferiores al sulfato y sólo el óxido cúprico presenta valores de utilización limitados (FEDNA, 1999).

La intoxicación por cobre es más frecuente en animales alimentados con concentrados. Esto es debido a que a pesar de que los pastos pueden contener más o menos cobre que los granos, la disponibilidad del mismo en los cereales es mayor, llegando a un coeficiente de absorción 10 veces superior (Suttle, 1986). Las diferencias específicas entre distintas semillas de gramíneas respecto al contenido de cobre y otros elementos antagonistas son relativamente bajas, siendo además las concentraciones normales reducidas si se comparan con las de la mayoría de los alimentos destinados al ganado.

La leche y los productos lácteos son pobres en cobre (1-2 mg/kg materia seca; Licata et al., 2004) aunque se pueden contaminar durante su elaboración y almacenamiento. Por el contrario, la concentración de molibdeno en la leche depende de la ingesta dietética, a diferencia del cobre, y puede elevarse siete veces por encima de lo normal (0,06 mg/l en ovejas y vacas). No obstante, el molibdeno de la leche sobrepasa el rumen por lo que tiene poco efecto sobre el estatus de cobre (Underwood y Suttle, 2002).

I.2. Necesidades de cobre

El nivel de cobre en la dieta necesario para el mantenimiento de la salud depende de la especie animal y sobre todo, como hemos indicado anteriormente, de numerosos factores nutricionales, estando sobre todo correlacionado con los niveles de molibdeno y azufre inorgánico (Nacional Research Council, 2000). Cuando las condiciones dietéticas son óptimas para la utilización del cobre, niveles de 8 a 10 mg/kg materia seca son suficientes para cubrir las necesidades en rumiantes (Nacional Research Council, 2000).

En momentos de alta producción láctea, crecimiento rápido o estrés las necesidades de cobre aumentan, por lo que estas recomendaciones son probablemente inadecuadas y deberían ser excedidas. También es bien sabido que ciertos minerales, nitratos, sulfatos, proteínas y plantas estrogénicas reducen la utilización de cobre; por ello todos estos factores deberían de ser identificados para determinar de forma precisa los requerimientos dietéticos de cobre en los animales (Underwood y Suttle, 2002).

La composición de la dieta es la responsable de determinar la proporción del cobre dietético que es absorbido y puede variar tanto que la ingesta de cobre *per se* poco va a condicionar la aparición de una deficiencia funcional de cobre. Se puede decir que tres son los factores más importantes: el tipo de alimento, el contenido relativo de molibdeno y azufre y la constitución genética del animal (Suttle, 1986).

I.2.1. Tipo de alimento

Al estudiar la composición de los alimentos que normalmente consumen los rumiantes se ha encontrado que existen grandes diferencias en la biodisponibilidad del cobre, lo cual condiciona de forma muy importante las necesidades nutricionales de los animales.

El cobre se absorbe con mayor facilidad en alimentos bajos en fibra como cereales y brassica, mientras que la absorción es más pobre en hierba fresca. La conservación de la hierba o heno y el ensilado generalmente mejoran su disponibilidad aunque

raramente los niveles de la cosecha no fibrosa y en el caso del silo hacen que las mejoras sean consistentes (Suttle, 1986).

Diversos componentes de la dieta, como el fitato, el ácido ascórbico, los tiomolibdatos, la fructosa o la fibra presentan la capacidad de acomplejarse con el cobre y por tanto limitar su absorción (Underwood y Suttle, 2002).

La intoxicación por cobre es esencialmente un problema en ganado en sistemas de explotación intensiva, pero no por el hecho en sí, si no porque su alimentación implica que la disponibilidad del cobre va a ser mayor. Siguiendo este razonamiento lógico, la deficiencia de cobre es un problema del ganado en pasto por la pobre disponibilidad del cobre en la hierba (Suttle, 1986).

I.2.2. Efectos del molibdeno y azufre en la disponibilidad del cobre

La capacidad del molibdeno y azufre para inducir deficiencia de cobre en rumiantes es un hecho perfectamente constatado (Whitelaw et al., 1984; Ladefoged y Stürup, 1995; Smart et al., 1992; MacPherson et al., 1997). Se ha acumulado suficiente información sobre las interacciones entre estos metales como para establecer ecuaciones que cuantifican un 78% de variación en la disponibilidad del cobre en ovejas en un determinado lugar (Suttle, 1983 a). Las interacciones con hierro, molibdeno y azufre van a condicionar las necesidades de cobre, y esto debe tenerse en cuenta antes de valorar la capacidad de los alimentos para proporcionar el cobre disponible necesario (Suttle, 1986).

I.2.3. La importancia de la constitución genética

La constitución genética cobra una gran importancia al conocerse que los desórdenes metabólicos del cobre podrían ser controlados por manipulación genética (Underwood y Suttle, 2002). Como se tratará de forma más específica en otros apartados de esta revisión bibliográfica, la influencia genética en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino, lo que ha permitido adaptar las razas (susceptibles o tolerantes al cobre) a las características de los pastos (Suttle et al., 2002). En ganado vacuno el efecto de la genética sobre las necesidades de cobre ha sido mucho menos estudiado, limitándose a un número reducido de razas, si bien hay evidencias de que existen diferencias genéticas en cuanto a sus necesidades de cobre (Littledike et al., 1995; Mullis et al., 2003).

II. Metabolismo y funciones del cobre

II.1. Metabolismo

II.1.1. Absorción

Aunque el mecanismo de absorción de cobre en el animal adulto no se conoce con precisión, se sabe que se lleva a cabo en varios tramos del tracto digestivo, desde el estómago al intestino grueso. En el caso de los rumiantes se limita principalmente a duodeno y yeyuno (Underwood y Suttle, 2002).

La capacidad máxima de absorción intestinal está dentro del rango del 30-60%. No obstante, de este cobre absorbido una gran parte se secreta, haciendo que al final las cifras que se manejen sean del 5-10% (Quiroz-Rocha y Bouza, 2001).

La absorción intestinal cuenta con dos componentes: por un lado el transporte activo que es saturable y mediado por metalotioneínas (se relaciona con concentraciones bajas de cobre) y la difusión simple, que es un mecanismo pasivo e insaturable (relacionado con concentraciones altas de mineral). Además, la absorción de los compuestos de cobre podría agruparse en dos categorías: aquellos que son absorbidos fácilmente como es el caso de hidróxidos, yoduros, glutamatos, citratos y pirofosfatos frente a los que tienen dificultada la absorción que son los sulfatos, óxidos, el cobre metálico y los compuestos de cobre no hidrosolubles (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001).

La valencia del ion de cobre influye en la disponibilidad del metal en el intestino (Nederbragt, 1984). En animales monogástricos el cobre se presenta normalmente como cobre divalente, mientras que en rumiantes se presenta predominantemente como cobre monovalente cuya absorción es más difícil que en su forma divalente.

Es importante señalar que además de las variaciones específicas en la absorción intestinal de cobre ya nombradas hay otras que son propias de las circunstancias del individuo como la edad, raza o propiamente idiosincrásicas. Así por ejemplo, el recién nacido tiene asegurado el aporte necesario de cobre mediante la absorción por picnocirosis de las macromoléculas intactas y el alto contenido de cobre en el calostro, además tiene una mayor capacidad de absorción y sus reservas son mayores (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Los animales monogástricos y los terneros absorben del 45-55 % del cobre dietético, lo que puede ser debido a los bajos niveles de hierro en su comida a la formación de sulfato de cobre por la reducción de sulfato a sulfito.

Bajo condiciones normales los animales monogástricos utilizan de un 30 a 50% del cobre dietético, mientras que los porcentajes disminuyen si se incluyen mayores

cantidades de cobre en la dieta. En rumiantes el sistema microbiótico en el rumen es un factor importante que determina la disponibilidad del cobre, lo que se denota claramente por la influencia de la producción de sulfuro en el rumen; se piensa que está unido el cobre a S^{2-} formando Cu_2S una forma más insoluble incluso que el CuS (Nederbragt, 1984). En el ambiente ruminal con un pH reducido, el cobre se puede presentar de forma monovalente, y de hecho se puede demostrar que muestras de rumen reducen fácilmente grandes cantidades de cobre iónico (Nederbragt, 1984). La razón de la vulnerabilidad del rumiante al déficit del cobre tiene su explicación en los procesos digestivos que tienen lugar en el rumen, donde se degradan las fuentes orgánicas e inorgánicas de azufre a sulfuro. Los protozoos del rumen juegan un papel muy importante en la generación de sulfuro; así se ha visto que en animales libres de patógenos que son extraídos mediante cesárea (Ivan, 1988) o mediante la administración de ionóforos antiprotozoarios (Van Ryssen y Barrowman, 1987), la absorción de cobre está aumentada. Durante la digestión ruminal la mayor parte del cobre liberado va a precipitar en forma de sulfuro de cobre y permanece sin absorberse, mientras que el liberado durante la digestión postruminal se une parcialmente a componentes no digeridos. En ovejas se han propuesto una serie de teorías para explicar la acumulación de cobre por el desequilibrio de la actividad o composición de la microflora del rumen, pero no hay evidencias que constaten estas teorías (Nederbragt, 1984).

Tanto en humanos como en animales se ha demostrado que la absorción intestinal de cobre se regula por las formas químicas en las que se presenta en el alimento, el estatus nutricional del individuo y numerosas interacciones con otros factores dietéticos que afectan a la biodisponibilidad. El transporte de cobre en el intestino delgado podría estar condicionado por una gran variedad de componentes dietéticos, incluyendo la fibra, fitatos, ácido ascórbico, tiomolibdatos y aminoácidos (Cousins, 1985).

Aunque no se conocen en detalle los mecanismos bioquímicos involucrados, hay evidencias de que la absorción intestinal de cobre se regula en gran medida por las necesidades del organismo, donde las metalotioneínas juegan un papel destacado en el mantenimiento de un estatus nutricional adecuado (Bremner, 1998). La razón por la que estas proteínas varían tanto en animales de genética y estados fisiológicos distintos no se conoce, algunas posibilidades podrían ser cambios en el flujo de cobre o ratio de síntesis/degradación de la proteína (Cousins, 1985). A modo de ejemplo, el cordero que es alimentado con leche puede llegar a absorber un 70-85 % del cobre ingerido, mientras que el destetado absorbe menos del 10%. Durante la gestación, el aumento en la retención de cobre en las ratas es en parte una consecuencia de la disminución de la excreción biliar del metal (Terao y Owen, 1977).

Cuando se enriquece la ración con molibdeno y azufre se forman tiomolibdatos que llevan a la formación de compuestos de cobre que son más complejos y además el cobre tiende a unirse más fuertemente al material particulado (Allen y Gawthorne, 1987 a,b), se reduce entonces la disponibilidad del cobre llevándolo a una absorción menor al 1% (Price y Chesters, 1985).

La absorción del cobre se va a ver mermada por la acción de antagonistas, y así cabe citar como los más importantes:

- Elementos de transición. Existen elementos químicos que son similares al cobre y que van a competir con él por los sitios de unión en los sistemas metabólicos específicos, incluyendo la absorción intestinal. Evans et al. (1970a) aislaron y purificaron unas proteínas metalafines en el duodeno de ganado vacuno y demostraron que el cadmio y el zinc desplazan al cobre de los puntos de unión sulfhídricos.
- Ácido ascórbico. El ácido ascórbico es reconocido como un antagonista del cobre en numerosas especies animales (Johnson y Murphy, 1988) probablemente debido a la capacidad de reducción de su forma divalente a la monovalente. Hunt et al. (1970) observaron una reducción significativa del cobre hepático en pollos con una dieta suplementada con ácido ascórbico, concluyendo que afectaba la absorción de cobre, o su utilidad y/o ambos. Evans et al. (1970b) demostraron una disminución en la unión de cobre a las metalotioneínas en intestino e hígado después de la adición de ácido ascórbico; el análisis espectral de las proteínas indica que la vitamina interactúa con las metalotioneínas y por eso inhibe la formación de mercáptidos. En experimentos llevados a cabo en animales de laboratorio alimentados con dietas deficientes de cobre y suplementados con 1-5% de ácido ascórbico se observaron mayores índices de mortalidad, pérdidas de peso y bajo valor de hematocrito y hemoglobina que en los animales control; así se sugería que el ácido ascórbico daña el estatus de cobre a través de una disminución en la absorción o un aumento en la movilización del mismo (Johnson y Murphy, 1988).
- Complejos dietéticos cúpricos. La disponibilidad del cobre se ve condicionada por la naturaleza de los componentes de la dieta. Existen investigaciones que demuestran que la proteína ingerida tiene un papel protector frente a la acumulación de cobre (McKee y Frieden, 1971) y que consiste en la formación de complejos macromoleculares que los invalidan para su absorción.
- Aniones. La forma más conocida como inhibidora sobre la absorción del cobre es el sulfito, hecho comprobado en numerosas especies animales como ratas, cerdos o el hombre (Underwood y Suttle, 2002).

II.1.2. Transporte y almacenamiento

El cobre a nivel intestinal se enlaza a una metalotioneína de la mucosa lo que limita su traslocación posterior (Cousins, 1985) y permite la adaptación a ingestiones excesivas (Woolliams et al., 1983). Después de la absorción intestinal el cobre es transportado a través de la sangre por la albúmina.

Para ser captado por el hígado se une a glutatión primero y después a metalotioneínas y otras proteínas citoplasmáticas, donde es utilizado para el metabolismo hepático, almacenado en forma de Cu-metalotioneínas o, si el aporte es excesivo, eliminado a través de la bilis. El cobre necesario para el metabolismo extrahepático abandona el hígado en forma de ceruloplasmina, cuya síntesis está condicionada por fenómenos como la inflamación, ciertas hormonas y niveles de cobre (Cousins, 1985).

En el caso de un déficit de cobre, se produce un aumento en la actividad hepática de los enzimas encargados de la síntesis de glutatión (Chen et al., 1995) que estimulan la eficacia en la captación de cobre por el hígado; lo mismo sucede en la exposición a un exceso de selenio (Hartman y van Ryssen, 1997).

La captación de cobre en el resto del organismo ocurre sobre todo debido a receptores de ceruloplasmina en la membrana celular (McArdle, 1992; Saenko et al., 1994), aunque también se observó *in vitro* que la albúmina y algunos aminoácidos como la histidina facilitan su captación.

La ceruloplasmina constituye la fracción de cobre plasmático más elevada en animales, a excepción de las aves donde la actividad de esta proteína en el torrente sanguíneo es muy escasa. En los animales no rumiantes constituye el 95% del cobre plasmático frente al 80% de los rumiantes. En vacuno los niveles de ceruloplasmina disminuyen drásticamente durante una deficiencia de cobre y pueden alcanzar niveles no detectables en ganado aparentemente sano (Humphries et al., 1983).

En la sangre, el cobre se encuentra principalmente en los eritrocitos, donde el 60% del total está asociado al enzima superóxido dismutasa (SOD) mientras que el 40% restante se encuentra libre. Este último está contenido en un compartimento dializable que Bush et al. (1956) designaron como *pool* lábil en el que está unido a aminoácidos y que probablemente es necesario para asegurar un adecuado suplemento para mantener la actividad enzimática superóxido dismutasa. El cobre total contenido en los eritrocitos permanece constante a pesar del estatus de cobre del animal y esto ocurre en la mayoría de las especies animales tanto en casos deficiencia como en ingestiones excesivas.

Ante situaciones de deficiencia de cobre se produce un estímulo del reciclaje al optimizar la eficacia de absorción, si bien los mecanismos involucrados en este proceso homeostático no se conocen en detalle. Tampoco se sabe hasta qué punto el

cobre es vulnerable a los tiomolibdatos capaces de estimular las pérdidas de cobre. Smith et al. (1968) obtuvieron un aumento de 2.5 veces en las pérdidas fecales endógenas de cobre en ovejas que recibían grandes suplementos de molibdeno (25 mg/kg) y azufre (4.5 mg/kg). Woollians et al. (1983), al igual que Freudenberger et al. (1987), observaron incrementos notables en la velocidad de depleción hepática del cobre al tiempo que veían un efecto de la estimulación del molibdeno de la ración sobre las pérdidas endógenas de cobre.

Por último comentar que la captación del cobre no va a condicionar la excreción del mismo por vía urinaria. Como el cobre circula en la sangre unido a la ceruloplasmina o se encuentra confinado dentro de los eritrocitos, es muy poco el cobre permeable en los capilares glomerulares, lo que hace que la excreción urinaria de cobre sea insignificante en todas las especies animales, aunque se sabe que en las ovejas aumenta ante la exposición a molibdeno (Smith et al., 1968; Marcilese et al., 1969).

II.1.3. Metabolismo hepático

El éxito en la adaptación a las variaciones en el aporte de cobre en la dieta se consigue gracias al almacenamiento hepático y la excreción biliar, si bien la proporción de cobre almacenado así como la capacidad de eliminación biliar varía ampliamente según la especie animal. Los rumiantes, especies más vulnerables a la deficiencia e intoxicación de cobre, almacenan los excesos de este micronutriente, mientras que los no rumiantes, que no cuentan con ningún riesgo, excretan por vía biliar el exceso de cobre y mantienen bajos los niveles hepáticos de este metal. Deben tenerse en cuenta también las diferencias entre especies en cuanto a la restricción de la acumulación hepática mediante excreción biliar; de hecho la incapacidad del ovino para la eliminación biliar de cobre explica su mayor vulnerabilidad a padecer procesos de intoxicación crónica frente a otras especies como el porcino donde esta capacidad no es limitada (Bremner, 1998).

En rumiantes cuando ocurre una depleción de cobre (por ejemplo ante una falta de ingestión en la dieta) el ritmo al que desciende el cobre hepático se correlaciona de manera positiva con las concentraciones previas a la depleción en este órgano (Woollians et al., 1983; Freudenberger et al., 1987).

En los tejidos extrahepáticos el metabolismo del cobre se limita sobre todo a la síntesis y degradación de enzimas cobre-dependientes, mientras que el hígado está implicado además en el mantenimiento de la homeostasis del cobre.

II.1.3.1. Distribución subcelular de cobre y almacenamiento hepático

Dentro del hígado, el cobre se encuentra asociado a distintas fracciones celulares en las que desempeña un papel específico, tanto formando parte de enzimas cobre dependientes como ligado a proteínas de almacenamiento.

Estudios de fraccionamiento subcelular, llevados a cabo principalmente por técnicas de centrifugación diferencial (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Saylor y Leach, 1980; Jenkins, 1989; Kumaratilake y Howell, 1989), consideran que en las células hepáticas el cobre está contenido en cuatro grandes fracciones, desempeñando unas funciones específicas en cada una de ellas:

- Fracción microsomal. Contiene al menos un 10% del cobre total en la célula hepática y representa las fracciones del retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y ribosomas. Está involucrada en la nueva síntesis de proteínas que contienen cobre que están siendo transportadas con el fin de su uso o secreción.
- Fracción nuclear. Contiene aproximadamente el 20 % del cobre total hepático en la mayoría de los mamíferos, si bien su contenido exacto es difícil de evaluar puesto que en esta fracción queda además englobado el cobre unido a restos de tejidos y células intactas. Se considera una organela que puede funcionar como un almacén temporal. Está constituido por ácido nucleico y proteínas básicas a las cuales se une el cobre.
- Fracción granular. En la mayor parte de los animales con un estatus adecuado representa el 20% del cobre total. Está compuesta por mitocondrias y lisosomas, éstos últimos con un papel vital para mantener la homeostasis del cobre. El material que no puede ser digerido o preparado para su excreción por el parénquima es almacenado dentro de los lisosomas, organelas que secuestran el exceso de cobre previa excreción biliar.
- Citosol. El sobrenadante final o citosol contiene la mayoría del cobre hepático en los mamíferos adultos. Está asociado en su mayor parte a proteínas específicas metal-afines como las metalotioneínas (principales puntos de almacenamiento temporal de cobre en la célula) aunque en menor medida también a enzimas cobre-dependientes como la superóxido dismutasa.

Es necesario señalar que la proporción de cobre en las distintas fracciones subcelulares mencionadas varía de forma muy destacable en función de diversos factores como la especie animal, edad y estatus de cobre.

VARIACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE COBRE DEPENDIENTES DE LA ESPECIE ANIMAL

En la mayoría de las especies de mamíferos con un estatus normal de cobre la mayor proporción de este metal (por encima del 50%) está localizada en el citosol, como almacenamiento temporal en forma de metalotioneínas. La capacidad de esta fracción para almacenar cobre va a depender de forma muy importante de la especie animal, siendo muy alta en aquellas, como el perro y el cerdo, que tienen una enorme capacidad de síntesis de metalotioneínas, en comparación con otras,

como los rumiantes, donde esta capacidad es muy limitada. A su vez, la escasa capacidad de los rumiantes y especialmente el ovino, para la síntesis de metalotioneínas hace que la excreción biliar de cobre vía lisosomal sea muy limitada, lo que conduce a su almacenamiento en concentraciones elevadas en la fracción granular.

LA EDAD COMO AGENTE MODIFICADOR DE LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE COBRE EN EL HÍGADO

La concentración hepática de cobre en la mayoría de las especies de mamíferos va aumentando de forma constante durante el periodo intrauterino, alcanza un máximo antes o en el momento del nacimiento y después disminuye hasta alcanzar los niveles encontrados en adultos (Underwood y Suttle, 2002). Evans et al. (1970c) demostraron con sus experimentos que los aumentos en las concentraciones hepáticas de cobre en animales inmaduros resultan de su limitada capacidad de eliminación biliar.

Al igual que la concentración total de cobre hepático, el contenido de cobre en las distintas organelas varía de forma destacable con la edad. Así, los estudios realizados con centrifugación diferencial en hígado humano (Porter, 1964), bovino (Porter et al., 1961) y de rata (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans et al., 1970c) demostraron que las fracciones granular y nuclear contienen el más alto nivel de cobre durante el desarrollo neonatal (con un total de casi un 80% del cobre total neonatal del hígado inmaduro) mientras que el citosol contiene únicamente un 15%. Durante el desarrollo, una vez que maduran los mecanismos homeostáticos de eliminación biliar, el contenido de cobre disminuye drásticamente en la fracción granular y nuclear y ligeramente en el citosol, mientras que el resto es distribuido en las organelas subcelulares en la proporción previamente descrita.

Las alteraciones de la distribución subcelular hepática que dependen de la edad señalan la existencia de un mecanismo homeostático de protección en las células hepáticas. Como la eliminación de cobre es limitada en el hígado inmaduro y esto causa un aumento de la concentración del mismo, los sitios de unión en el citosol llegan a saturarse y el exceso de cobre pasa a estar unido a los lisosomas o es incorporado a las proteínas de las mitocondrias y del núcleo. Cuando el animal madura y la capacidad de eliminación biliar del cobre mejora, la acumulación de este metal dentro de la célula disminuye y así también disminuye la necesidad de unión del cobre a organelas celulares. Cuando el movimiento del cobre hepático alcanza su máxima capacidad, la mayor proporción de cobre hepático está unido a metalotioneínas dentro del citosol en la mayoría de las especies, a excepción de los rumiantes que presentan una capacidad de síntesis de metalotioneínas muy limitada (Evans, 1973; Cousins, 1985).

EFFECTO DEL ESTATUS DEL COBRE EN SU DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR

Ante el acúmulo de cobre en el hígado la distribución subcelular se asemeja a la de los neonatos (Gregoriadis y Sourkes, 1967; Evans et al., 1970c), en ambos casos el contenido de cobre en las organelas subcelulares y la concentración hepática siguen una función lineal. La capacidad de unión es alta en la fracción granular y nuclear, mientras que en el citosol es limitada; el retículo endoplasmático liso y las proteínas del núcleo son los encargados de mantener la homeostasis del cobre hepático.

La distribución subcelular de cobre, zinc, hierro y molibdeno fue investigada en el hígado de terneros pre-rumiantes alimentados con lactorreemplazantes, comparando los efectos de una dieta control de 10 mg Cu /kg (dosis control) y 1000 mg Cu /kg (dosis alta), o con la dosis alta de cobre de 1000 mg/kg junto con zinc. En los animales del grupo control el cobre se localizaba principalmente en el núcleo y la fracción lisosomal, el zinc principalmente en el citosol, el hierro en el citosol y la fracción nuclear, mientras que el molibdeno se presentaba en todos los compartimentos con un mínimo en los microsomas. Los terneros que recibían dosis altas de cobre presentaban marcados aumentos de cobre en el núcleo y la fracción del citosol, el zinc aparecía reducido en el citosol, el hierro aumentado en el núcleo y el molibdeno disminuido en todas las fracciones (Jenkins y Hidiroglou, 1989).

II.1.3.2. Influencia materna en el metabolismo fetal del cobre

Salvo la especie ovina la mayoría de los animales neonatos presentan una mayor concentración de cobre en el hígado que los adultos (Underwood y Suttle, 2002). Gracias al almacén mineral en el hígado fetal, el recién nacido obtiene el cobre necesario para los primeros estadios de vida. Las reservas neonatales se reducen si se produce una restricción del aporte materno, con esto se acelera su depleción posterior (Wiener et al., 1984 a, b).

El feto tiene una máxima prioridad frente a la madre a la hora del reparto del cobre dietético. Se ha observado que vacas con concentraciones de cobre hepáticas bajas (<24.8 mg/kg peso seco) pueden criar terneros que contienen en sus hígados 330 mg/kg materia seca de cobre (Gooneratne y Christensen, 1985); sin embargo con valores maternos por debajo de 16,5 mg/kg peso seco, los valores fetales descienden en más de un 50%.

En cuanto a la concentración de cobre en la leche materna se ha observado que la secreción de este oligoelemento se reduce cuando el aporte dietético es inadecuado, si bien no se incrementa al suplementar cobre en la ración (Whitelaw et al., 1983). También es destacable la existencia de diferencias en los niveles de cobre en leche entre especies, mientras que en vaca y cabra son bajos (0,15 mg/l Cu) la cerda

secreta niveles altos (0,75 mg/l Cu) durante un periodo breve, posiblemente debido a que se trata de una lactación de una camada grande y de rápido crecimiento (Underwood y Suttle, 2002).

De lo dicho anteriormente se desprende que el almacenamiento de cobre en el hígado fetal a expensas de la madre, seguido de la excreción de cobre sufrida durante la lactación, hacen mermar de forma considerable las reservas hepáticas de la hembra. En casos de deficiencia de cobre, las escasas reservas de la madre pueden no ser suficientes para cubrir las necesidades, lo que hace que la descendencia nazca con reservas hepáticas de cobre disminuidas y que consuman leche donde el contenido de cobre está muy por debajo de lo normal (Suttle et al., 1970).

II.1.4. Proteínas implicadas en el metabolismo del cobre

II.1.4.1. Ceruloplasmina

Como hemos indicado, la ceruloplasmina es la principal proteína exportadora de cobre hepático hacia los tejidos. Presenta un peso molecular de 132000 daltons y contiene 6 átomos de cobre por molécula (Frieden, 1980) y liga del 90 al 95% del cobre en el torrente sanguíneo (Cousins, 1985). Después de un tiempo la ceruloplasmina vuelve al hígado donde se degrada en los lisosomas.

La ceruloplasmina ejerce un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio entre el cobre hepático y extrahepático. Por una parte, el aumento de la concentración hepática de cobre induce la síntesis de ceruloplasmina, lo que permite una mayor redistribución del metal hacia los tejidos periféricos, así como el mantenimiento de los niveles de cobre hepáticos dentro de los límites fisiológicos, si bien es cierto, que por encima de una determinada concentración de cobre en el hígado los niveles de ceruloplasmina alcanzan una fase de meseta (Eckert et al., 1999). Por otra parte, tal y como han demostrado Campbell et al. (1981) la absorción de cobre hacia los tejidos está estrictamente relacionada con la liberación de ceruloplasmina por parte del hígado.

Evans et al. (1970c) comprobaron en ratas que la disminución de la concentración hepática de cobre durante el desarrollo neonatal coincide con un aumento de la ceruloplasmina en plasma.

La ceruloplasmina se considera como una proteína de fase aguda, con marcadas propiedades antiinflamatorias (Denko, 1979), así como de protección frente a fenómenos de peroxidación lipídica (Dormandy, 1980). Como ejemplos del aumento de ceruloplasmina asociada a procesos inflamatorios podemos citar enfermedades crónicas comunes como la artritis (Sorenson, 1978) y la enfermedad periodontal (Freeland et al., 1976). El mecanismo fisiopatológico que explica este aumento de

actividad de ceruloplasmina es complejo e involucra tanto la estimulación de su síntesis como la secreción desde las células hepáticas.

Varios experimentos han demostrado, además, que la ceruloplasmina en plasma se eleva en respuesta a determinados aumentos patológicos de cobre en el hígado, como por ejemplo en la cirrosis biliar humana, la enfermedad de Wilson (Sternlieb, 1980) y cirrosis biliar primaria (Jain y Gerlowski, 1981). En estos casos, el aumento de la función de la ceruloplasmina como antioxidante se debe posiblemente al aumento de la producción de metabolitos oxidantes por parte del cobre, entre los que se incluye O_2^- y H_2O_2 .

Finalmente, debemos destacar la influencia de determinados metales sobre la actividad de la ceruloplasmina. Así, se ha demostrado que la administración parenteral de cadmio estimula de forma significativa la actividad de la ceruloplasmina sérica, junto con un aumento del cobre hepático. La administración de plomo también aumenta ligeramente el nivel de ceruloplasmina. En contraste, la inyección de plata disminuye de forma intensa la actividad de ceruloplasmina y la concentración de cobre en suero y aumenta ligeramente el cobre hepático (Sugawara y Sugawara, 1987).

II.1.4.2. Metalotioneínas

Las metalotioneínas se aislaron por primera vez en 1957 en el riñón de caballos como una proteína unida al cadmio (Margoshes y Vallee, 1957; Kagi y Vallee, 1960). Sin embargo, no fue hasta que se demostró en animales de experimentación que su síntesis podía ser estimulada por metales, cuando atrajeron el interés de los investigadores, en este primer momento se sugirió que las metalotioneínas podrían jugar un papel crucial en la detoxificación del cadmio y otros metales pesados (Bremner y Beattie, 1990).

En 1970, transcurrida más de una década, se demostró que las metalotioneínas también participaban en el metabolismo de metales esenciales. Así, se descubrió que estas metaloproteínas están mayoritariamente unidas a cobre y zinc en un amplio rango de tejidos (Bremner y Young, 1976) y que su síntesis puede ser inducida por la administración de uno de estos metales esenciales (Webb, 1972; Bremner et al., 1978), además de por una gran variedad de estímulos fisiológicos, incluyendo el hambre y el estrés (Oh et al., 1978; Sobocinski et al., 1978). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto su importancia fisiológica, nutricional así como toxicológica y se sugiere que su papel en la detoxificación de metales no esenciales, como el cadmio, en realidad podría ser una coincidencia fortuita debido a las propiedades químicas similares entre el cadmio, cobre y zinc (Webb, 1972).

Desde este momento, las metalotioneínas han sido aisladas de una gran variedad de especies y tejidos animales, siendo más características del hígado, riñón e intestino,

mostrándose en hígado de animales adultos como una proteína que contiene zinc (Nordberg y Nordberg, 2000).

En cuanto a las propiedades físico-químicas de las metalotioneínas, Kagi y Vallee (1960) aislaron y caracterizaron estas proteínas en una gran variedad de muestras biológicas. Demostraron que estas metaloproteínas cuentan con una cadena polipeptídica única de 61 aminoácidos de los cuales el 25-30 % contienen residuos de cisteína, capaz de unir a 5-7 átomos de cobre por molécula y presentan una secuencia homóloga indicando la conservación de la estructura primaria a lo largo de la cadena evolutiva (Knudsen et al., 1998).

Centrándonos en el papel de las metalotioneínas en el metabolismo intrahepático del cobre, debemos señalar que tras muchos años de investigación su papel no está totalmente esclarecido. La unión del exceso de cobre a las metalotioneínas en el citosol, para posteriormente ser eliminado a través de los lisosomas vía biliar, parece ser la hipótesis más aceptada dentro de la detoxificación celular de este metal (Bremner, 1987). De hecho, está demostrado que en el hígado de animales expuestos a altos niveles de cobre se encuentran cantidades importantes de complejos cobre-metalotioneínas en los lisosomas y otras fracciones particuladas del hígado (Riordan y Richards, 1980; Johnson et al., 1981; Mehra y Bremner, 1984); en estos animales, la rápida desaparición del cobre del citosol reflejaría la absorción de la Cu-metalotioneína por los lisosomas y otras organelas para su posterior eliminación biliar.

Sin embargo, el hecho de que no se detecten anormalidades en el metabolismo del cobre a nivel hepático en animales deficientes de zinc (en los cuales las metalotioneínas unidas al cobre están ausentes) parecen indicar que la metaloproteína no juega un papel obligatorio en el transporte intracelular del cobre (Bremner, 1987).

No obstante, las grandes diferencias entre especies animales en cuanto a su capacidad de síntesis de metalotioneínas, podrían explicar la diferencia de susceptibilidad a la acumulación de cobre y subsiguiente toxicidad. De hecho la toxicidad por cobre es baja en aquellas especies como el perro o el cerdo donde una gran parte de cobre está ligado a metalotioneínas a nivel citosólico, y por el contrario, es muy alta en otras como la oveja en las que solamente una pequeña proporción de cobre está ligado de esta forma (Bremner, 1987; Bremner y Beattie, 1990).

En casos concretos como cerdos en crecimiento (Mehra y Bremner, 1984) o determinadas razas de perros como los Bedlington terriers o los Doberman pinscher (Johnson et al., 1981), que presentan un defecto inherente en el metabolismo de cobre que conlleva a una acumulación excesiva de este metal, o en el hígado de

humanos con un cierto tipo de enfermedad colestática (Janssens et al., 1984), la mayor parte del cobre está unido a metalotioneínas del citosol, de lisosomas y otras porciones particuladas. En contraste, ovejas con acúmulo de cobre a nivel hepático (Taylor et al., 1988; Mehra y Bremner, 1984), ratas alimentadas con suplementos de cobre (Bremner y Mehra, 1983) y animales deficientes de zinc de muchas especies animales (Bremner, 1980, 1991 a,b) muestran tan sólo una pequeña porción de cobre asociado a metalotioneínas.

Las metalotioneínas también juegan un papel importante como almacenamiento de cobre en los animales neonatos. Como hemos indicado, las concentraciones hepáticas de cobre/zinc son muy elevadas en fetos y neonatos, estando en un porcentaje muy alto ligados a metalotioneínas (Bremner et al., 1977; Bakka y Webb, 1981; Mason et al., 1981). Así, se ha encontrado que la distribución de cobre en fetos y neonatos de humanos (Riordan y Richards, 1980), vacuno (Hartman y Weser, 1977) y hamsters (Bakka y Webb, 1981), se parece a la de los animales adultos expuestos a niveles excesivos de cobre.

A la hora de estudiar el metabolismo hepático de las metalotioneínas no podemos olvidar su capacidad de fijación a otros elementos, tanto esenciales (zinc) como tóxicos (principalmente cadmio, aunque también mercurio o plata) puesto que van a determinar importantes interacciones entre estos metales, tanto a la hora de su síntesis, competencia por los puntos de fijación, como en su degradación (Bremner, 1987).

En primer lugar debemos señalar la distinta afinidad de los distintos cationes por los grupos tiol de las metalotioneínas. En general se asume la siguiente secuencia de afinidad: $\text{Hg(II)} > \text{Cu(II)} > \text{Ag(I)} > \text{Bi(III)} > \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Co(II)} > \text{Fe(II)}$ (Funk, 1987; Vasak, 1991). Day et al. (1984) comprobaron que el Cd^{+2} y el Hg^{+2} desplazan al Zn^{+2} de Zn-MT hepática en ratas *in vivo* y *ex vivo*; cuando el hígado era pre-inducido con cobre, cadmio y mercurio estos elementos podían desplazar al zinc de (Zn, Cu)-MT *in vivo* y *ex vivo*, pero al contrario de lo esperado el mercurio era incapaz de desplazar al cobre de las metalotioneínas. No obstante, debemos señalar que la unión de estos cationes a los puntos de fijación de las metalotioneínas no solo depende de su respectiva afinidad por los residuos de cisteína, sino que también está relacionada con su cantidad relativa en la célula (Hamilton et al., 1987).

Estudios experimentales han demostrado que el cadmio y el cobre compiten por los sitios tiol de las metalotioneínas (Wentik et al., 1988). Las metalotioneínas inducidas por el cadmio se van a unir con más facilidad al cadmio que al cobre (Foulkes, 1993). La capacidad de unión a las metalotioneínas va a depender de las concentraciones relativas de cada metal, de manera que si se presentan concentraciones de cadmio relativamente altas en relación a los ratios de cobre hepáticos se facilita el desplazamiento del cobre (Cosson, 1994). Estas relaciones negativas entre el cadmio

y el cobre hepático se observaron en ganado vacuno y ovino expuesto experimentalmente a cadmio o que procedía de zonas contaminadas (Koh y Judson, 1986; Wentik et al., 1988; Smith et al., 1991 a, 1991b; Miranda, 1999; Miranda et al., 2005).

El cobre desplaza al zinc y al cadmio de la proteína (Bremner y Marshal, 1974) esto nos ayuda a explicar el desarrollo de una deficiencia de cobre en animales con dietas altas en zinc y cadmio. La distinta afinidad de varios metales por las metalotioneínas es también importante para comprender como es el ratio de degradación de la proteína en función del contenido del metal (Bremner y Mehra, 1983). La unión tan sólida de la metalotioneína al cobre se ilustra también por la incapacidad del EDTA para desplazar al cobre de la proteína, mientras que si es capaz de hacerlo en el caso del zinc y en menor medida del cadmio. El tetratiomolibdato (TTM) es extremadamente efectivo en el desplazamiento del cobre de las metalotioneínas, lo cual permite explicar los efectos adversos del molibdeno en el metabolismo del cobre en rumiantes (Bremner y Mehra, 1983).

Whanger y Weswig (1970) demostraron con sus estudios que el cadmio, la plata y el zinc antagonizan el metabolismo del cobre dentro de la célula hepática. Para ello eliminaron los efectos competitivos a nivel intestinal inyectando cobre en ratas que tenían bajos niveles de cobre en la dieta y analizaron la actividad de la ceruloplasmina en plasma. Los resultados experimentales demostraron que la ceruloplasmina es almacenada más fácilmente en ratas con dietas bajas en cobre que en animales que bajo las mismas condiciones se suplementan de cadmio, plata y zinc. Además estos mismos autores en 1971 estudiaron el efecto del suplemento dietético de zinc sobre la distribución subcelular del cobre hepático, indicando que la acumulación de zinc en hígado se asocia con una disminución del cobre dentro de los microsomas mientras que la fracción de zinc aumenta. La teoría de que el zinc desplaza al cobre de los microsomas fortalece la hipótesis de Whanger y Weswig (1970) de que la biosíntesis proteica está asociada sobre todo a la fracción microsomal.

II.1.4.3. Otras proteínas involucradas en el transporte intracelular

Los chaperones de cobre y las cobre ATP-asas son proteínas citosólicas pequeñas, ubicuas, que se encargan de transportar cobre en el citoplasma hacia el lugar de utilización por proteínas dependiente de cobre (Mercer, 1997; Dameron y Harrison, 1998; Harrison et al, 1999; Horn y Tümer, 1999; Harris, 2000, 2001; Arnesano et al., 2004). La identificación de proteínas homólogas en bacterias, levaduras y humanos revela la conservación de su estructura y su función en el metabolismo de cobre a lo largo de la escala evolutiva (Peña et al., 1999).

Aunque todavía no se conocen en detalle, la función de los cobre-chaperones es la de prevenir la interacción inadecuada con otros componentes celulares. Se programan con una doble función, por un lado la transferencia y por otro la prevención de la exposición citoplasmática a iones de cobre en tránsito (Harrison y Dameron , 1999). Estas funciones no sólo son necesarias para proteger la célula del efecto deletéreo del cobre libre, sino también para asegurar que el cobre pueda identificar la proteína específica (el mecanismo para transferir el cobre fue determinado experimentalmente por Pufahl en 1997). Las investigaciones disponibles sugieren que cada proteína cobre-dependiente en la célula se sirve de un chaperón específico de cobre, de hecho se está comprobando que muchas alteraciones genéticas ligadas al metabolismo del cobre, como las Enfermedades de Wilson o de Menkes en medicina humana, podrían obedecer a defectos genéticos en estas proteínas transportadoras (Harris y Gitlin, 1996).

II.1.5. Distribución tisular de cobre

Como hemos indicado el hígado es el principal reservorio de cobre a nivel orgánico. Los niveles de cobre en hígado en rumiantes son muy altos si los comparamos con otras especies de monogástricos como los cerdos, caballos e incluso el hombre. Los rumiantes, especialmente el ganado ovino y a diferencia de otras especies, presentan una capacidad de eliminación biliar limitada, y por ello, cuando el consumo es superior a las necesidades fisiológicas, se produce un almacenamiento continuado de cobre en este órgano hasta alcanzar concentraciones superiores a 600 e incluso 1200 mg/kg (Miller et al., 1993; Underwood y Suttle, 2002). Mientras que el cobre se acumula en el hígado no se produce ninguna alteración patológica, sin embargo cuando se supera su capacidad de almacenamiento, después de periodos de exposición superiores a 6 meses, el cobre se libera a la sangre, provocando una crisis hemolítica que conduce en la mayor parte de los casos a la muerte del animal.

En el riñón las concentraciones de cobre son bajas y no suelen exceder los 10 mg/kg peso fresco. En contraste a lo que sucede en el hígado, los niveles renales de cobre en los rumiantes no se ven afectados por esta capacidad de almacenamiento. Únicamente en los casos de intoxicación crónica, cuando se supera la capacidad de almacenamiento hepático y se desencadena la crisis hemolítica se produce un aumento significativo de los niveles renales de cobre (Puls, 1994), aumento que va acompañado también de los niveles de hierro en este órgano.

Los órganos que más contribuyen al peso de la canal, que son músculo, grasa y hueso, presentan concentraciones de cobre muy bajas. Por este motivo, cuando no se incluye el hígado en la canal, las concentraciones de cobre máximas son relativamente bajas. En general, se indica una cantidad de 1,2 mg/kg de cobre peso fresco para ovejas y 0,8 mg/kg de cobre peso fresco para el bovino (Grace, 1983),

mientras que en especies no rumiantes, como la rata y el pollo, las concentraciones en la canal son mucho más elevadas (4,8 y 1,7 mg/kg peso vivo respectivamente; Suttle, 1987). Señalar además que en la lana del ganado ovino se depositan grandes cantidades de cobre (Grace, 1983; Underwood y Suttle, 2002).

En sangre los niveles de cobre también son bajos, aunque reflejan la cantidad de oligoelemento que el animal ingiere, especialmente en los casos donde los niveles en la dieta son altos (Gummow, 1996; Radostits et al., 2002).

Finalmente señalar que ante un déficit de cobre ocurren descensos importantes en las concentraciones de cobre en los tejidos, siendo especialmente destacables en el riñón y leves en el cerebro (Suttle y Angus, 1976).

II.1.6. Excreción biliar

La bilis es la principal vía para la excreción de cobre en mamíferos (Luza y Speisky, 1996; Underwood y Suttle, 2002). En menor medida el cobre también es excretado durante la transpiración y lactación. En casos de obstrucción biliar o en la enfermedad de Wilson se excretan grandes cantidades de cobre por el sistema urinario. La excreción biliar permite por un lado combatir los excesos de cobre en la dieta y además da una opción al reciclaje enterohepático del cobre, hecho de gran importancia en rumiantes si tenemos en cuenta la baja eficacia de absorción a nivel intestinal del cobre procedente de la ración en estas especies animales.

En cuanto a los mecanismos de eliminación biliar, debemos señalar que todavía no están totalmente esclarecidos. Gooneratne et al. (1989b) han propuesto tres mecanismos o vías de transferencia de cobre del hígado a la bilis para su excreción: (1) la vía transbiliar en la que el cobre pasa a la bilis sin entrar a través del hepatocito, (2) la transhepatocelular, en la que el cobre entra en los hepatocitos, se une a transportadores celulares y posiblemente a metalotioneínas y se elimina a través de la bilis y (3) la hepatolisosomal, la vía más importante en la que el cobre entra en los hepatocitos, se une a las metalotioneínas para facilitar su captación por parte de los lisosomas y a través de estas vesículas se elimina en la bilis. A su vez, la pérdida de metalotioneínas desde los lisosomas u otras organelas podría quizás ocurrir por una excreción directa de la proteína intacta (monomérica) o en forma agregada (Sato y Bremner, 1984).

Se ha sugerido que la degradación de la metaloproteína *in vivo* ocurre dentro de los lisosomas y que la facilidad de traslado de los metales unidos es un importante paso en el proceso degradativo (Feldman et al., 1978; Bremner y Mehra, 1983). El hallazgo de metalotioneínas ricas en cobre dentro de los lisosomas es consistente con esta hipótesis. El cobre está unido fuertemente a las metalotioneínas, siendo incluso resistente a la hidrólisis por los extractos lisosómicos (Bremner y Mehra, 1983).

La velocidad de excreción biliar es muy variable dependiendo de la especie animal. De forma experimental se ha demostrado que terneros a los que se les administra cobre excretan menos de un 4 % del total infundido en los tres días siguientes a la administración, mientras que en cerdos se alcanzan cifras del 80-90% (Charmley y Symonds, 1985). Estas diferencias en la excreción biliar explican la enorme susceptibilidad de los rumiantes a padecer procesos de intoxicación crónica de cobre en comparación con los cerdos. En este mismo experimento se demostró que el ganado vacuno puede trasladar por vía intravenosa el cobre infundido de la circulación sistémica al hígado más rápidamente que los cerdos, pero no es capaz de excretarlo vía biliar; en contraste, los cerdos trasladan el cobre infundido más lentamente del plasma, pero son capaces de excretar casi todo el cobre infundido a bilis en un periodo de 3 días (Charmley y Symonds, 1985).

Similares resultados han sido descritos en otros experimentos. Lynne et al. (1982) mostraron con sus observaciones en vacas que aproximadamente el 95% del cobre infundido es aclarado rápidamente del plasma, sin embargo, detectaron pequeñas cantidades del cobre excretado en orina y bilis durante los 10 días después de la infusión. Según Phillipo y Graca (1983), la pérdida total de cobre en bilis parecería estar determinada por las concentraciones hepáticas de cobre, aunque no estaba afectada de forma significativa por las distintas concentraciones de cobre en la dieta en un estudio realizado en vacuno.

II.2. Funciones del cobre

Hace casi un siglo que se conoce la necesidad de que el cobre se encuentre en la dieta de los mamíferos, así como la existencia de patologías asociadas tanto a su deficiencia - entre las que podemos destacar por su importancia la anemia, depresión del crecimiento, diarrea severa, cambios en la coloración del pelo o de la lana (acromotriquia), ataxia neonatal, alteraciones en el crecimiento con presencia de huesos largos, débiles y frágiles, infertilidad temporal e insuficiencia cardíaca (Miller et al., 1993; Benedito et al., 1998; Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002), y que afectan fundamentalmente a los rumiantes en pasto - como a su toxicidad por una exposición excesiva.

No obstante, es destacable lo poco que se conocen las causas exactas de por qué la deficiencia de cobre en la dieta provoca enfermedad clínica. Esto se debe, desde el punto de vista práctico, a que la deficiencia de cobre está confinada en su mayor parte a los rumiantes en pasto, y en seguida se trata con la administración de cobre por distintas vías. Sin embargo, se le ha prestado poca atención a las variaciones en la respuesta a la deficiencia de cobre que se han registrado tanto intra como entre especies.

Aunque se sabe que el cobre es un elemento multifuncional, básico para al menos diez metaloenzimas, donde cada una de ellas cuenta con un papel importante en el organismo, todavía no se conocen en detalle los mecanismos fisiopatológicos de las distintas alteraciones orgánicas que aparecen ante una deficiencia de cobre, lo que hace difícil indicar porque aparece una sintomatología específica ante una deficiencia de cobre.

En su mayor parte la función del cobre en las metaloenzimas involucra una transferencia de electrones y la unión enzimática a oxígeno molecular. La presencia de un fallo localizado en la actividad de una cuproenzima no evidencia de forma substancial una lesión aunque muchas veces se interpreta de esta forma.

A continuación citamos las principales enzimas dependientes de cobre presentes en los tejidos de mamíferos (Tomado de Frieden, 1986).

- Citocromo-c-oxidasa (CCO): localizada en la membrana mitocondrial interna. Participa en el transporte electrónico. La falta de esta enzima desencadena una deficiente producción energética, conducción nerviosa y fallo respiratorio.
- Superoxido dismutasa (SOD): localizada en citoplasma de cerebro, hígado, corazón y eritrocitos. Actúa en la dismutación de radicales superóxido, y su déficit desencadena degeneración del SNC y convulsiones.
- Tirosinasa: localizada en los melanocitos del ojo y de la piel, participa en la producción de melanina y su déficit desencadena despigmentación cutánea.
- Dopamina-β-hidroxilasa: está presente en el plasma y médula adrenal y participa en la producción de catecolaminas. La falta de esta enzima desencadena desequilibrio en el centro hipotalámico, hipotermia, anorexia, fallo respiratorio, somnolencia, deshidratación y ataxia.
- Amino-oxidasa: está presente en plasma, cerebro, pulmón, riñón, intestino, placenta, y participa en la oxidación de mono-, di- y poliaminas. El déficit produce aumento de los niveles de histamina y consecuentemente urticaria.
- Lisil-oxidasa: Presente en el cartílago, hueso y sangre, participa en la formación de colágeno y elastina. El déficit de esta enzima provoca alteraciones en el tejido conectivo, ruptura vascular, anormalidades óseas, etc.
- Ceruloplasmina: está presente en el plasma. Participa en el transporte de cobre y movilización de hierro y antioxidantes. Los bajos niveles de esta enzima provocan anemia.

Experimentos nutricionales han demostrado que el cobre es necesario para una gran variedad de funciones entre las que cabe citar la formación ósea, función cardíaca, desarrollo de tejido conectivo, la mielinización del cordón espinal, queratinización y pigmentación de tejidos (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002).

II.2.1. Eritropoyesis

En 1928 Hart et al. establecieron la necesidad del cobre y del hierro para prevenir la anemia en ratas que eran alimentadas con leche, demostrando así la esencialidad del cobre como constituyente de la dieta (Adham y Song, 1980).

La sangre es uno de los tejidos diana del cobre ya que este metal está fuertemente involucrado en los procesos de síntesis de la médula ósea (Barceloux, 1999a). La anemia se desarrolla cuando la deficiencia de cobre es intensa o prolongada; cuando los niveles de cobre se reducen a 0,095-0,190 mg/dl no es posible mantener la hematopoyesis normal.

Aunque no está totalmente esclarecido el papel del cobre en la hematopoyesis, y por tanto la patogenia de la deficiencia del mismo, todo parece indicar que en vacuno y ovino se trata de una anemia hipocrómica y macrocítica, que en perros es normocrómica y normocítica, mientras que en otras especies como cerdos, conejos y ratas la anemia es hipocrómica y microcítica, como la anemia por deficiencia de hierro. Aunque en un principio se sostuvo la idea de que el metabolismo del hierro agrava la deficiencia de cobre en los animales, hay evidencias de que en algunas especies el efecto eritropoyético no se relaciona con su papel en la síntesis de hemoglobina. Prueba de ello fueron los experimentos realizados en conejos y ratas con suplementos de cobre, en los que el efecto eritropoyético no iba acompañado de un aumento en la cantidad de hemoglobina. Lahey et al. (1952) comprobaron que ante deficiencias de cobre en cerdos a los que se le suplementaba este mineral la microcitosis desaparecía antes de que la concentración corpuscular de hemoglobina volviera a la normalidad, lo que puede ser debido a que el ratio de células en maduración esté retrasado; así bajo este punto de vista, estudios morfológicos en perros con anemia por deficiencia de cobre demostraron que la médula ósea era más hiperplásica que en perros con anemia por deficiencia de hierro y que contaba con un mayor número de células inmaduras.

Se han propuesto numerosos mecanismos de participación del cobre en la hematopoyesis:

- En animales con un estatus normal de cobre, la alta actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa en la médula ósea está totalmente asociada a la hematopoyesis, mientras que en animales cobre-deficientes esta enzima está seriamente disminuida hasta un nivel que afecta la hematopoyesis; en los

eritroblastos de los animales cobre deficientes las mitocondrias están ampliadas pudiendo presentar una estructura espiral o apilada.

- La ceruloplasmina es esencial para la promoción de saturación de hierro de la transferrina y en su utilización en la médula ósea. En animales cobre deficientes la actividad plasmática de ceruloplasmina está disminuida de forma marcada, mientras que en animales con un estatus de cobre dentro de la normalidad su actividad es mayor a la mínima requerida para la máxima movilización de hierro. Parece ser que los defectos de movilización de hierro tan sólo se detectan en procesos de deficiencia de cobre largos y severos, cuando la ceruloplasmina disminuye intensamente, de ahí que la anemia pueda ser un signo tardío de deficiencia de cobre.
- Junto con los efectos en la síntesis de hemoglobina, la disminución severa de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en animales deficientes afecta a la síntesis de fosfolípidos y retrasa la maduración de los glóbulos rojos.
- En cerdos con deficiencia de cobre el tiempo de supervivencia en la circulación de los glóbulos rojos es bastante más corto de lo normal y se atribuye al daño provocado por la peroxidación en las membranas de los glóbulos rojos por el anión superóxido, además de la disminución del enzima superóxido-dismutasa. Finalmente, señalar que se han observado cuerpos de Heinz dentro de los eritrocitos en corderos deficientes de cobre.

II.2.2. Protección frente a oxidantes

El cobre puede tener un papel protector frente a la oxidación con dos vías de actuación, la primera relacionada con el equilibrio del metabolismo del hierro y la segunda a través de la enzima cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD). Así, el descenso de CuZnSOD se correlaciona con una disminución del cobre hepático y, a su vez, en esta situación se encuentran reducida la capacidad defensiva del hígado de otros radicales libres como son los superóxidos (Taylor et al., 1988).

La ceruloplasmina ayuda a defender al organismo como agente antioxidante al capturar el hierro libre y los radicales libres (Saenko et al. 1994), y proporciona además interacciones con otros nutrientes que tienen propiedades antioxidantes como manganeso, selenio y vitamina E.

II.2.3. Desarrollo cardíaco

Se han registrado casos de cardiomegalia en ganado vacuno tras sufrir episodios de deficiencia de cobre. Gross y Prohaska en 1990 demostraron en ratones que la actividad del enzima dopamina- β -monooxigenasa (DBM) se encuentra disminuida en situaciones de deficiencia de cobre, mientras que el metabolismo de las

catecolaminas puede verse seriamente afectado tanto en el corazón como en el cerebro. Se han observado también defectos en la síntesis de proteínas miofibrilares en animales deficientes de cobre asociadas a una baja actividad del enzima citocromo-c-oxidasa (Chao y Allen, 1992).

En ratas (Abraham y Evans, 1972) se ha demostrado que la disminución de la actividad de la citocromo-c-oxidasa en el miocardio que se produce en la depleción de cobre se acompaña de cambios morfológicos con un agrandamiento del corazón. Resultados similares han sido también descritos en ganado vacuno (Mills et al., 1976). En muchas especies animales se ha descrito que ante deficiencias severas o prolongadas de cobre, si el corazón está involucrado, puede aparecer una muerte repentina atribuida a una ruptura del miocardio con hemopericardio y hemotórax, mientras que en la depleción crónica se presenta paro cardíaco local con un reemplazo fibroso en el miocardio.

Estudios morfológicos, tanto en ganado vacuno como en animales de laboratorio deficientes de cobre, ponen de manifiesto un agrandamiento en la fracción mitocondrial de las fibras del miocardio que contribuyen a la aparición de cardiomegalia; el área ocupada por las mitocondrias agrandadas excedía la de las miofibrillas que aparecían desplazadas y deformadas. No obstante, estas mitocondrias cardíacas, aisladas *in vitro*, tenían una función normal con respecto a la respiración y fosforilación (Goodman y Dallman, 1970).

Los estudios histoquímicos llevados a cabo para evaluar la posibilidad de una adaptación de las mitocondrias ante situaciones de déficit de cobre, mostraron que mientras se producía la disminución de la actividad citocromo-c-oxidasa aumentaban otras enzimas oxidativas mitocondriales. Por ello, se sugirió que el agrandamiento del miocardio junto con el incremento en la actividad enzimática se podría explicar por el aumento de las mitocondrias; de forma alternativa, los mecanismos oxidativos para la producción energética podrían también estar aumentados por el uso de vías glucolíticas que son menos eficientes.

A nivel histológico, se ha observado que en ganado vacuno con deficiencia crónica de cobre, el corazón aparece más firme (hecho asociado al cambio fibrótico) a pesar de que el miocardio es suave, grueso y pálido. La mayor anormalidad era un espesamiento de la red de fibras miocárdicas, si bien de forma local las fibras miocárdicas atroficas aparecían reemplazadas por tejido fibrótico.

La cronicidad con la que aparecen las lesiones en ganado vacuno contrasta con el carácter severo y agudo de las deficiencias de cobre experimentales en cerdos, donde el corazón presenta un aspecto pálido y friable. Así, en cerdos que morían por rotura cardíaca no se hallaron lesiones específicas en las fibras de miocardio; en

estos animales el principal mecanismo de los daños patológicos eran posiblemente los cambios encontrados en las arterias coronarias (Underwood y Suttle., 2002).

II.2.4. Desarrollo de los vasos sanguíneos

El cobre ejerce un papel esencial en la formación de los vasos sanguíneos a través de la metaloenzima lisil-oxidasa. De hecho, una de las lesiones registradas con más frecuencia y de mayor importancia en la deficiencia de cobre es la formación defectuosa de los tejidos elásticos que se debe a la falta de dicha enzima. Como consecuencia de esta falta de actividad de la lisil-oxidasa, los enlaces de los residuos de lisina resultan dañados y el tejido elástico sufre fallos estructurales por la supresión de la síntesis de elastina (Rucker y Tinker, 1977), de hecho los test mecánicos realizados en segmentos aislados de aorta muestran que las fuerzas tensionales están disminuidas. La apariencia anormal de la elastina defectuosa en ratas con déficit severo de cobre se reconoce fácilmente en microscopio óptico y electrónico (Kitano, 1980; Prohaska y Heller, 1982).

La debilidad progresiva de las paredes arteriales conlleva la aparición de aneurismas y muerte repentina por la rotura de las arterias principales en numerosas especies animales como pollos, pavos, cerdos, conejos y cobayas (Underwood y Suttle, 2002). Sin embargo, ni la fragmentación del tejido elástico ni la ruptura de la aorta han sido observados en ganado vacuno con deficiencia de cobre (Mills et al., 1976) ni en ovino (Cleary y Fanning, 1975), si bien en vacuno se han constatado cambios en el tejido elástico del ligamento nuchal (Mills et al., 1976).

A nivel de la circulación periférica también se ha observado una fragmentación del tejido elástico de los vasos, lo cual se traduce como hemorragias internas que podrían ser fatales, y en algunos animales hemorragias subcutáneas generales. Así, se ha visto que las deficiencias severas de cobre provocaron lesiones hemorrágicas en embriones de pollo, hemorragias subcutáneas generales en pollos y petequiales en orejas de conejos.

También se han observado casos de hidropericardio, hidrotórax, efusión pleural y ascitis, si bien estos efectos son difíciles de aislar de la anemia y los desordenes cardiacos con los que se relaciona. Gallagher (1979) sugirió que probablemente los factores que contribuyen al desarrollo del edema sean los fallos miocárdicos, hepáticos y endoteliales que siguen a la severa depresión de la respiración celular. También se podrían desarrollar pequeñas hemorragias si las células del músculo liso, que son muy sensibles a los efectos de la noradrenalina, presentaran espasmos intermitentes.

Lo que parece claro, sin embargo, es que los defectos hemorrágicos son mucho más probables en fetos y recién nacidos, concretamente en las fases de crecimiento y

órganogénesis, y en relación a esto, cabe destacar el papel activo del cobre como componente de ciertas sustancias angiogénicas que promueven la migración de células endoteliales y el crecimiento de capilares (Mc Auslan et al., 1980).

II.2.5. Desarrollo óseo

El cobre ejerce una función importante en el desarrollo óseo a través de la enzima lisil-oxidasa, encargada del entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina, puesto que la mineralización del colágeno es un importante paso en la fase temprana del desarrollo óseo, siendo para ello fundamental el correcto establecimiento de los enlaces de colágeno (Suttle, 1987).

Las anomalías en el desarrollo óseo varían ampliamente entre especies y razas. Las alteraciones de la osificación endocondrial que provoca un crecimiento óseo anormal (osteocondrosis) solo pueden afectar a los animales en crecimiento, de forma que la morfología ósea depende del ritmo de crecimiento, la distribución del peso corporal, el movimiento, e incluso el ritmo de crecimiento de las pezuñas.

El ensanchamiento de las epífisis en los huesos de las extremidades posteriores es una manifestación frecuente del ganado vacuno en crecimiento con deficiencia de cobre durante dicho periodo. En ganado ovino y vacuno se ha podido apreciar las costillas en aparición de “rosario” debido al sobrecrecimiento de las articulaciones costocondrales; los animales adultos pueden presentar osteoporosis sin alteraciones en el crecimiento de la epífisis pero con evidencias de un daño en la actividad osteoblástica y también es frecuente observar una mayor incidencia de fracturas óseas espontáneas. En corderos jóvenes estabulados nacidos de ovejas deficientes en cobre pueden aparecer osteoporosis y una reducción de la actividad osteoblástica pero sin cambios morfológicos de los huesos.

En cerdos jóvenes sometidos a deficiencia de cobre muy intensa se observó una reducción de la actividad osteoblástica, el ensanchamiento de la zona epifisaria y el desarrollo de alteraciones óseas notables con fracturas y malformaciones graves, incluyendo marcadas curvaturas de las extremidades anteriores.

II.2.6. Desarrollo del sistema nervioso central

El papel del cobre en el desarrollo del sistema nervioso central se descubrió en corderos en condiciones de explotación (Brady y Helvig, 1984).

Estudios experimentales enfocados hacia el estudio de la deficiencia de cobre en corderos se contraponen en la patogenia del estado atáxico conocido como “ataxia neonatal” o “ataxia enzoótica”, que es uno de los primeros trastornos reconocidos de la deficiencia de cobre. Por un lado se piensa que la lesión primaria se localiza en las neuronas con una degeneración secundaria de mielina y por el otro que la aplasia de

la mielina cobra una mayor importancia (Bremner y Davies; 1976; Bremner et al., 1978). En cuanto a la deficiencia de citocromo-c-oxidasa descrita en este tipo de procesos, hay autores que afirman que esta enzima es necesaria para mantener la integridad neuronal y axonal, mientras que otros defienden su papel en el mantenimiento de la síntesis de fosfolípidos; la dificultad desde el punto de vista temporal y anatómico para realizar estudios en los tractos nerviosos prolongan esta falta de acuerdo, es más, se ha visto que pueden ocurrir lesiones en la materia blanca y gris en animales normales bajo el punto de vista clínico (Bremner y Mehra, 1983). También se observaron descensos de otros enzimas dependientes de cobre, como el peptidil- α -amidamonoxygenasa (PAM) en el cerebro de ratas recién nacidas de madres deficientes en cobre (Prohaska y Bailey, 1995), ya que del cobre dependen numerosas moléculas biogénicas como las hormonas reguladoras del apetito gastrina y colecistoquinina.

En la patogenia de la ataxia neonatal debemos situar la reducción de la actividad de la citocromo-c-oxidasa, enzima esencial para la síntesis de fosfolípidos, que como se sabe son esenciales para la formación apropiada de la mielina a nivel del sistema nervioso central. En este sentido se debe señalar que en animales sanos la actividad de la citocromo-c-oxidasa es muy elevada en el sistema nervioso, y que en las fases iniciales de la deficiencia de cobre en el cerebro ocurre una depleción menor de su actividad, en comparación con otros tejidos como el hígado, posiblemente para poder asegurar la integridad del sistema nervioso; no obstante, en deficiencias de cobre avanzadas hay una pérdida de hasta un 70% de su actividad enzimática (Abraham y Evans, 1972), lo que se traduce en el desarrollo de anomalías del sistema nervioso central. También se constató una reducción importante de la actividad citocromo-c-oxidasa en la región de núcleo rojo del cerebro, así como del contenido en cobre, en la ataxia neonatal tardía.

Uno de los factores más crítico en la patogenia de la ataxia neonatal parece ser la concentración de cobre en el cerebro. El valor umbral entre clínica normal y enfermedad se estableció en 3 mg/kg peso húmedo en todo el cerebro; por debajo de este valor hay una asociación clara entre la concentración de cobre y la actividad de la enzima citocromo-c-oxidasa en el núcleo rojo. Smith (1980) encontró en fetos de bovinos deficientes en cobre, una disminución del 60% en la actividad de la citocromo-c-oxidasa en cerebro, si bien los efectos de esta falta de actividad enzimática no son importantes antes del periodo perinatal. El foco lesional en la materia gris del cerebro de corderos afectaba al nacimiento (ataxia neonatal congénita) y a la médula espinal en casos tardíos; este hecho refleja los picos de síntesis de desarrollo de mielina en esos lugares del día 90 de gestación al día 20 después del nacimiento (Lee et al., 1968).

El desarrollo postnatal de la ataxia neonatal tardía ha sido confirmado a través de controles de suplementación de cobre después del nacimiento, pero el tiempo del tratamiento (31 ± 10 días) sugirió que la mielina es vulnerable a la deficiencia de cobre por la razón que sea durante un periodo prolongado de tiempo.

II.2.7. Cambios en el tejido elástico

Cuando la enzima lisil-oxidasa se encuentra afectada se puede observar una rotura aórtica, desórdenes articulares y osteoporosis.

La osteocondrosis observada en ciervos rojos con deficiencia de cobre se acompaña habitualmente de graves defectos de los cartílagos articulares (Thompson et al., 1994), lo que probablemente se deba a un desarrollo alterado del colágeno y de la elastina, que provoca hemorragias subperiostiales e inserciones tendinosas defectuosas. La marcha anormal observada en rumiantes deficientes en cobre que algunos describen como “en pie de paloma” no son simples alteraciones óseas sino una combinación de desordenes que afectan al tejido óseo y conectivo.

Rucker et al. (1996) observaron como en ratas deficientes en cobre una disminución del 50-60% de la actividad de lisil-oxidasa en la piel no se acompañaba de modificaciones en la estructura del colágeno.

Se cree que la formación defectuosa de la cáscara del huevo de la gallina se produce por anomalías bioquímicas similares (Baumgartner et al., 1978), al igual que la delgadez de la red de capilares alveolares del pulmón de las aves (Buckingham et al., 1981).

Fahrenbach et al. (1966) describieron el proceso de elastogénesis del ligamento nuchal en vacas y en sus observaciones enfatizaron el alto nivel de la actividad celular en animales cobre-deficientes. La alteración del ligamento nuchal provoca una dislocación de la escápula que causa una “joroba” mientras baja la cabeza.

II.2.8. Pigmentación

Entre las fenoloxidasas que contienen cobre se encuentra el enzima tirosinasa, que está involucrada en la producción de melanina a partir de tirosina. Este proceso es extremadamente sensible a los cambios en el estatus de cobre, de hecho las pérdidas de pigmento en lana, pelo y plumas son un marcado índice de la deficiencia de este mineral (Underwood y Suttle, 2002).

La despigmentación suele ser el síntoma clínico más precoz de la deficiencia de cobre en todas las especies animales de capa pigmentada. Así, la falta de pigmentación en la lana de ovejas negras y la formación de pelo gris en ganado vacuno, especialmente alrededor de los ojos, puede ya aparecer con niveles

marginales de cobre en la dieta, pero suficientes para evitar la aparición de otros síntomas de deficiencia. En las ovejas, el proceso de pigmentación es tan sensible a cambios en la ingestión de este oligoelemento que se pueden encontrar bandas de fibras de lana despigmentadas alternadas con pigmentadas, según se retire o añada cobre a la ración (Underwood y Suttle, 2002).

La pigmentación del pelo es reducida, el rojo se transforma en amarillo, el negro en gris, sobre todo alrededor de los ojos, punta de las orejas y en los flancos (Herd, 1990). Para controlar rápidamente el problema, podrían incluirse en el rebaño varias ovejas de lana negra en las que la alteración de la pigmentación es fácilmente detectable. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la despigmentación es un síntoma común que aparece en otros procesos carenciales como deficiencias de vitaminas o cobalto (Underwood y Suttle, 2002). Por este motivo, desde el punto de vista bioquímico así como diagnóstico, la existencia de bajas concentraciones de cobre y acromotriquia en el mismo animal no se pueden interpretar simplemente como causa y efecto.

Además de la despigmentación del pelo y de la lana, se registra alopecia y alteración en la estructura de las fibras de la lana que ocurren como resultado de una queratinización alterada. En ovejas con un estatus muy bajo de cobre una de las primeras alteraciones que aparece es el fallo de los folículos para comunicar estructura característica a las fibras de lana, lo que le da un aspecto de “lana de acero”; esto ocurre cuando los grupos sulfhidrido de prequeratina se oxidan formando grupos disulfuro que producen enlaces de unión en la queratina, ya que para realizar esta transformación son necesarias enzimas Cu-dependientes.

II.2.9. Inmunocompetencia

El cobre juega un papel esencial en el funcionamiento normal del sistema inmune de los rumiantes. Hay evidencias de un aumento del número de leucocitos en vacas jóvenes deficientes en cobre (Arthington et al., 1996; Gengelbach et al., 1997). El cobre juega un papel muy importante en la función efectiva de los linfocitos B, T y los neutrófilos, macrófagos y función del complemento (Jones y Suttle, 1981; Arthur y Boyne, 1985; Gengelback y Spears, 1998). En animales de laboratorio la deficiencia de cobre puede afectar al número de células que intervienen en la inmunidad, aumentando los mastocitos (células inespecíficas del sistema inmune) y disminuyendo las subpoblaciones de células T (células específicas del sistema inmune) (Mulhen y Koller, 1988).

En cuanto a la susceptibilidad a las infecciones, en estudios realizados en ganado ovino en las colinas escocesas para valorar las causas de la mortalidad en un rebaño, entre ellas las genéticas, se observó que las infecciones microbianas eran la causa más importante y que había una correlación significativa entre la susceptibilidad a la

infección y la deficiencia de cobre. Así, se constató que se producían más pérdidas en razas con menor eficacia para la utilización de cobre, mientras que éstas eran reducidas en animales que recibían suplementos de cobre o en aquellas razas que genéticamente tenían un estatus de este mineral más elevado (Woolliams et al., 1986). Se registró que los animales deficientes en cobre eran más susceptibles a padecer infecciones específicas (*Salmonella typhimurium* y *Pasteurella haemolyticum*) al igual que sucede en animales de laboratorio (Brewer et al., 1983). La debilidad se sitúa en los leucocitos del complejo inmune, la alteración de sus funciones está asociada a la deficiencia de superóxido-dismutasa, que es una enzima que contiene cobre y que posee actividad bactericida (Brinckerhoff et al., 1983). Esta susceptibilidad es tan temprana en la vida de la oveja que la inhabilita para conferir inmunidad pasiva a sus crías vía calostro, de hecho se ha observado que la mortalidad perinatal también está aumentada en rebaños que presentan deficiencias de cobre, si bien disminuye cuando se añaden suplementos de cobre al final de la gestación.

En vacas jóvenes con una deficiencia de cobre inducida por molibdeno las respuestas febriles a infecciones experimentales de tipo viral se mantuvieron inalteradas (Arthington et al., 1996) o no estuvieron relacionadas con el contenido de cobre (Gengelbach et al., 1997).

II.2.10. Nuevas implicaciones del cobre en el sistema nervioso

Estudios recientes sitúan al cobre, junto con otros oligoelementos como el manganeso, en la etiología de importantes patologías nerviosas, entre ellas la Encefalopatía espongiiforme transmisible bovina (Brown y Mohn, 1999; Mercer, 2001; Bounias y Purdey, 2002; Opazo et al., 2003) o la Enfermedad de Alzheimer (Berthon, 2000; Strausak et al., 2001; Angel et al., 2002; Lech et al., 2002; Perry et al., 2003).

El metabolismo del cobre está regulado por finísimos mecanismos de control homeostáticos, como indica el hecho de que la concentración de cobre libre a nivel citoplasmático es inferior a 10^{-18} M. Estos sistemas de regulación están integrados por numerosas proteínas situadas a varios niveles biológicos como membranas citoplasmáticas, organelas o citosol. Entre ellas podemos nombrar a una nueva familia de chaperones solubles con la función de distribuir eficazmente el tráfico intracelular de los iones de cobre (O'Halloran y Culotta 2000; Rosenzweig y O'Halloran, 2000); estos chaperones se encargan de hacer llegar iones de cobre a diferentes proteínas que necesitan este oligoelemento para obtener la máxima actividad enzimática, entre ellas la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial o la superóxido dismutasa en el citosol. En particular, la superóxido dismutasa, cobre y zinc dependiente, actúa limitando la reactividad oxidativa de ciertos radicales libres, catalizando la dismutación de superóxidos a productos intermediarios menos

reactivos y por lo tanto regulando el estatus redox de las células, lo que obviamente tiene un impacto significativo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

Entre las proteínas relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas se han descrito dos proteínas que ligan cobre: la proteína precursora de amiloide (PPA) relacionada con la enfermedad de Alzheimer (AD) (Selkoe, 1997) y la Proteína priónica (PrP) relacionada con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Prusiner, 1991). Aunque todavía no se conocen en detalle los mecanismos fisiopatológicos involucrados se cree que estas proteínas participan en el transporte de cobre desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Bajo ciertas circunstancias todavía no bien establecidas, estas proteínas podrían ganar actividad prooxidativa debido a una incorrecta adquisición de cobre, lo que explicaría algunos aspectos relacionados con el daño oxidativo que aparece en estas enfermedades neurodegenerativas.

Purdey (2000) planteó tras la estimulación con manganeso que la liberación de ceruloplasmina por el hígado conducía a su posterior incorporación como manganeso (II) y su oxidación a manganeso (III) que es letal. La ceruloplasmina, una oxidasa que contiene cobre es capaz de oxidar neuromediadores moleculares como la 6-hidroxidopamina, sin liberar potentes derivados tóxicos de oxígeno (Floris et al., 2000). Esto sugiere una conexión adicional con el sistema de priones, a través del balance del cobre, transporte del metal y comunicación celular. El cobre está involucrado en la agregación de prion humano (106-126), principalmente a uniones a determinados aminoácidos (His-111, Met-109 y Met-112) según Jobling et al. (2001) con la consecuente neurotoxicidad. Por otro lado, los iones de cobre pueden inducir a priones naturales que pueden convertirse en proteasa-resistente e insoluble-detergente.

En la patogenia de esta enfermedad podrían también ocupar un papel destacado las metalotioneínas. Así, en un estudio llevado a cabo por Hanlon et al. (2002) en el que se compararon animales con encefalopatía espongiforme bovina, animales con otra enfermedad neurológica distinta y animales clínicamente sanos, se encontró que al igual que en estudios anteriores ocurría un aumento en la inmuno-reactividad de las metalotioneínas I/II en los tejidos medulares del sistema cerebral de los animales afectados por encefalopatía espongiforme bovina, indicando que estas proteínas podrían jugar un papel todavía sin identificar en la respuesta a la infección por priones.

También se han descrito casos de lesiones similares a la encefalopatía espongiforme bovina en terneros con niveles de cobre en hígado y cerebro elevados y con actividades de ceruloplasmina plasmática muy disminuida, lo que sugiere una conexión en la patogenia con la Enfermedad de Wilson en humana, donde al no poder

distribuirse de forma adecuada a nivel orgánico el cobre hacia los tejidos se acumula principalmente en hígado y sistema nervioso central causando importantes lesiones (Wada et al., 1995).

III. Acumulación crónica de cobre

El cobre es un elemento esencial para la vida, realizando multitud de funciones en numerosos órganos y tejidos. Sin embargo, en la gran mayoría de las especies animales puede resultar altamente tóxico cuando se encuentra en concentraciones excesivas.

Existen grandes diferencias entre las distintas especies animales en cuanto a la cantidad máxima de cobre que pueden tolerar sin que este metal resulte perjudicial para el organismo. De entre los animales domésticos, sin lugar a duda, la oveja es la especie más susceptible (no es capaz de incrementar la excreción biliar de cobre ante un aumento de exposición), mientras que los cerdos son altamente tolerantes, y de hecho en esta especie animal se utilizan altos niveles de cobre como promotores de crecimiento en la dieta. Las diferencias de tolerancia a niveles altos de cobre en la dieta entre rumiantes y no rumiantes pueden relacionarse también en gran parte con el metabolismo del azufre, así como con diferencias en los niveles en la dieta de azufre, molibdeno, zinc, hierro y selenio (Underwood y Suttle, 2002). En la especie canina, a pesar de presentar en general una tolerancia alta al cobre, se han descritos episodios de toxicidad crónica en ciertas razas de perros, como los Bedlington Terrier o los Doberman (Haywood et al., 1996; Hyun y Filippich, 2004), debido a que presentan un defecto congénito en la metabolización/excreción de niveles normales de cobre en la dieta.

Dentro de la intoxicación por cobre en rumiantes debemos distinguir dos tipos, la *forma aguda*, bastante infrecuente, debido a la ingestión de concentraciones anormalmente altas de cobre en un espacio de tiempo breve, y la *forma crónica*, la más frecuente, que se debe a la acumulación de cobre en el hígado en concentraciones muy elevadas, y cuya etiología se relaciona en la mayoría de los casos con niveles de cobre en la dieta no necesariamente muy elevados pero sí por encima de las necesidades nutricionales durante periodos de tiempo prolongados.

Aunque nos vamos a centrar en este capítulo en la intoxicación crónica, vamos a hacer una breve reseña de la intoxicación aguda. La causa principal de la INTOXICACIÓN AGUDA por cobre, sin lugar a duda, es la suplementación excesiva de este mineral en la dieta, bien por ingestión oral o por vía parenteral. Ésta puede ser iatrogénica, de ahí el cuidado con el que deben ser calculadas las dosis en función del peso vivo del grupo de tratamiento, o de forma accidental, debido a una suplementación innecesaria en animales con un alto grado de acumulación hepática. Cuando la vía de exposición es la oral, el cuadro clínico que muestra el animal es de una gastroenteritis aguda con dolor abdominal, diarrea y en ocasiones muerte. La intoxicación aguda por una dosis oral única de cobre se produce a una concentración

de 20-50 mg/kg materia seca en corderos, 130 mg/kg en ovejas y 200 mg/kg en vacas. Los potros y cerdos son más resistentes que los rumiantes y los niveles de tolerancia se sitúan en 300 mg/kg (Seawright, 1982; Nacional Research Council 2000). La inyección parenteral de dosis elevadas de cobre también puede causar una intoxicación en todas las especies de rumiantes. Las dosis necesarias para inducir una intoxicación pueden ser variables dependiendo de la especie animal, tipo de compuesto y vía de administración. A modo orientativo podríamos hablar de 10-50 mg de CuCa EDTA en ovejas y 50-300 mg de sulfato de cobre pentahidratado en vacuno administrado subcutáneamente (Howell y Gooneratne, 1987). Aunque con menor frecuencia, también se han descrito episodios de intoxicación aguda ligados a la polución que se origina por el uso de aerosoles, purín de cerdo, e incluso basura industrial, así como por tratamientos veterinarios con el consumo de antihelmínticos que contienen cobre, baños de pie y fungicidas (Humphreys, 1990).

En casos de intoxicación aguda por cobre en ganado ovino la muerte suele ocurrir antes de 3 días después de la inyección, aunque en vacuno pueden tardar 12 días. Los animales comienzan a sentirse débiles y letárgicos y muestran una coloración amarilla de las mucosas. Es frecuente encontrar hemólisis y hemoglobinuria, así como una elevación importante de las enzimas hepáticas como la sorbitol deshidrogenasa. El examen postmortem de los animales revela la existencia de lesiones hemorrágicas (petequias y equimosis) en las serosas y un exceso de fluido en las cavidades corporales, congestión y edema pulmonar; el hígado se muestra aumentado de tamaño, congestionado y hemorrágico. Si ha ocurrido hemólisis la orina muestra un color rojo oscuro (Howell y Gooneratne, 1987). El examen histológico del hígado muestra necrosis de las células hepáticas parenquimatosas. En los animales que mueren rápidamente muy pocas células sobreviven alrededor de la vena central, estando esta zona llena de sangre. En animales que sobreviven más tiempo es frecuente encontrar infiltrados de leucocitos polimorfonucleares aunque la reacción de las células de Kuffer es mínima. En el riñón se observa degeneración y necrosis de los túbulos contorneados proximales. Al cuantificar los niveles de cobre en estos tejidos se observa una elevación de los mismos, aunque poco marcada. La extensión y severidad de las lesiones en hígado parecen correlacionarse con las concentraciones de cobre. El mecanismo de intoxicación por cobre ha sido asociado con un daño oxidativo, que causa peroxidación lipídica de las membranas de los hepatocitos y desnaturalización de la hemoglobina en los glóbulos rojos (Goyer, 1986). Los efectos de la intoxicación aguda de cobre en las especies no rumiantes son menos intensos y se caracterizan por una inhibición del crecimiento, anemia, distrofia muscular, alteraciones en la reproducción y longevidad disminuida (Underwood y Suttle, 2002).

III.1. Etiopatogenia

El ganado mantenido en un régimen de explotación intensivo es el más susceptible a padecer procesos de intoxicación crónica por cobre, si bien también se detectan episodios de toxicidad en animales en pasto.

Se puede decir que existen 3 circunstancias principales que determinan el padecimiento de una intoxicación crónica por cobre: (1) la ingesta alta de cobre junto con unos niveles adecuados o bajos de molibdeno, (2) cuando la dieta contiene bajos niveles de molibdeno pero los niveles de cobre son de normales a elevados y (3) la ingestión de plantas hepatotóxicas.

Cuando la etiología de la enfermedad se sitúa en la ingesta de niveles elevados de cobre, en la mayor parte de las ocasiones el exceso de mineral tiene su origen en la propia dieta, bien por un contenido alto de cobre en los forrajes o bien (lo más frecuente) asociado al empleo durante periodos de tiempo largos de suplementos minerales por encima de las necesidades del animal.

En la literatura científica existen numerosos ejemplos de intoxicación crónica por cobre en ganado ovino asociada a niveles altos en la dieta (Howell y Gooneratne, 1987). En ganado vacuno, a pesar de que tradicionalmente se consideraba una especie poco susceptible y no se incluía dentro de los paneles de diagnóstico diferencial con otros procesos que cursan con crisis hemolítica, también existen numerosos ejemplos de intoxicaciones crónicas por cobre donde el exceso de mineral es la causa del proceso. En muchas ocasiones se trata de errores en la formulación de los suplementos minerales. Así por ejemplo, Croubels et al. (2001) describen un episodio de toxicidad en terneros alimentados con lactorreemplazantes, que por un error en la formulación contenía niveles de cobre entre 120 y 159 mg/kg materia seca; en este caso murieron cuatro animales mostrando los signos típicos de una crisis hemolítica y la determinación de la concentración de cobre en hígado puso de manifiesto niveles entre 297 y 500 mg/kg peso fresco. Perrin y col (1990) describen un caso de intoxicación crónica en un rebaño vacuno de leche donde también un error en la empresa suministradora del pienso dio lugar a un concentrado con una concentración de 800-1000 mg cobre/kg, o lo que es lo mismo, 400-500 mg de cobre/Kg de la ración completa; en este caso 44 animales murieron mostrando síntomas de intoxicación, 215 tuvieron que ser sacrificados debido al deterioro de su estado físico y la disminución de la producción láctea y la mortalidad de los terneros nacidos de las hembras expuestas durante la gestación a esa dieta alcanzó el 50%.

En otros casos la intoxicación de cobre tiene un origen iatrogénico, debido a la utilización incorrecta de suplementos de cobre o productos que contienen niveles elevados del mismo. Como ejemplo podríamos citar la intoxicación en terneros

neonatos debido a la administración de bolos de óxido de cobre descrita por Hamar et al. (1997). El episodio sucedió en Nebraska (USA) en una zona con deficiencia de cobre en la que debido a la falta de eficacia de otros suplementos se recomendó el empleo de bolos de óxido de cobre. En el conjunto de los 8 rebaños afectados, el 7,1% de los animales suplementados murieron mostrando un cuadro de intoxicación por cobre entre las 6 y 8 semanas de edad. Los estudios histológicos confirmaron el diagnóstico, donde las concentraciones de cobre en hígado y riñón superaron en la mayoría de los casos los 1000 y 250 mg/kg peso fresco respectivamente.

Sullivan et al. (1991) describen un caso de intoxicación en terneros de entre 2 y 4 meses de edad en cinco granjas debido a la suplementación de la dieta con antihelmínticos que contenían cobre; siete animales murieron y en el estudio postmortem, además de las lesiones típicas de intoxicación por cobre, se observaron concentraciones de cobre en hígado entre 277 y 684 mg/kg y niveles de cobre en riñón entre 1,1 y 82 mg/kg.

En otras ocasiones los altos niveles de cobre proceden del propio alimento. Así, citar el episodio de intoxicación por cobre descrito en un rebaño de vacuno en Brasil alimentado con gallinaza en la que murieron 146 de las 1000 cabezas de ganado con síntomas de intoxicación crónica por cobre (Tokarnia et al., 2000). Los niveles de residuo en hígado, que se situaron por encima de 1000 mg/kg peso fresco, confirmaron la intoxicación y el análisis de dos muestras de la gallinaza empleada, con un contenido en cobre de 362 y 323 mg cobre/kg (más de un orden de magnitud superior a las necesidades fisiológicas de esta especie animal) permitió establecer la causa de dicha intoxicación.

En otras ocasiones, sin embargo, la suplementación de cobre puede ser adecuada (o al menos estar dentro de los límites que marca la legislación para suplementos animales) y la susceptibilidad a la intoxicación podría estar ligada a ciertos factores estresantes o a la deficiencia de otros oligoelementos en la dieta. Así por ejemplo citar el incidente descrito por Galey et al. (1991) en una zona deficiente de cobre en California en dos rebaños de terneros de aptitud cárnica donde tras la administración de una solución de edetato de cobre disódico por vía parenteral (120 mg de cobre en animales con un peso superior a 150 Kg), 16 animales murieron con signos de intoxicación por cobre. Al tratarse de un nivel de suplementación adecuado, los autores incidan que la susceptibilidad de estos animales al cobre podría situarse en una deficiencia de selenio, puesto que en ambos casos las granjas estaban localizadas en un área deficiente en este segundo oligoelemento. De hecho, está bien establecido que el selenio es un antioxidante esencial en los animales, que aumenta la tasa de supervivencia y minimiza la oxidación celular en ratas a las que se les administran dosis elevadas de cobre (Dougherty y Hoekstra, 1982).

En la misma línea podríamos citar el episodio de toxicidad descrito por Tremblay y Baird (1991) en dos vacas adultas de raza Holstein, pertenecientes a granjas diferentes, con un cuadro de anemia hemolítica y donde el estudio tisular postmortem reveló niveles de cobre compatibles con intoxicación por este metal. En ambos casos tanto los niveles de cobre en la dieta como en los suplementos minerales utilizados era adecuado, lo que lleva a los autores a concluir que podría tratarse de una interacción con niveles bajos de molibdeno o incluso a la presencia de algún factor estresante que precipitase la crisis hemolítica en estos animales que por motivos desconocidos presentaban un nivel de acumulación de cobre en hígado elevado.

De forma similar, Bradley (1993) describe también un episodio de intoxicación por cobre en vacuno lechero de raza Holstein con el resultado de 9 muertes de 63 animales (14%) tras la suplementación con 37 mg/kg de cobre en el alimento durante un período de 2 años. Aunque se trata en principio de un nivel de cobre tolerado por esta especie animal, junto con el hecho de que no se identificaron otras causas que predispongan a la intoxicación de cobre (como un contenido bajo de molibdeno en la dieta) lleva a sugerir, al igual que en el caso anterior, la posibilidad de que se trate de una predisposición genética de esta raza a la acumulación de cobre en el hígado. De hecho, en un estudio previo llevado a cabo en terneros en Galicia por nuestro grupo de investigación se pone de manifiesto que los animales de raza Holstein acumulan niveles de cobre en hígado un 60% superiores a los de raza Rubia Gallega (Cruz, 2005, Miranda et al., 2006).

La intoxicación crónica en vacuno se puede producir además por la contaminación de los pastos por residuos de minería o emisiones industriales y basura, o por el empleo de purines de cerdo ricos en cobre en los pastos destinados al ganado vacuno (Grobler y Swan, 1999 a, b; Tokarnia et al., 2000). Sargison y Scout (1996) describen un caso de intoxicación en terneros lactantes de una edad comprendida entre 4 y 12 semanas, y cuyas madres se habían alimentado con productos procedentes de la propia explotación, en la que se había empleado una elevada cantidad de purines de cerdo ricos en cobre como fertilizante durante los últimos 20 años. Los animales mostraron los signos típicos de una intoxicación crónica por cobre, destacando que los principales afectados eran de raza Aberdeen Angus, que mostraron una prevalencia seis veces superior (32,3%) a los de la raza Charolesa (5,5%).

La patogenia de la acumulación de cobre ha sido estudiada en profundidad en ganado ovino (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1987, 1989; Haywood et al., 2001). Aunque todavía no se conocen en detalle los mecanismos patogénicos implicados en la acumulación crónica de cobre en el hígado a nivel molecular se considera que la susceptibilidad de esta especie se asocia con la incapacidad de acumular el exceso de cobre en las metalotioneínas en el hígado, lo

que a su vez limita su capacidad de excreción biliar, fundamentalmente a través de los lisosomas hepáticos. Cuando se supera la capacidad de almacenamiento de cobre en el hígado se produce la lisis de los hepatocitos cargados de cobre con la consiguiente salida del metal libre al torrente circulatorio, lo que a su vez origina una importante crisis hemolítica que termina en muchos casos con la muerte del animal.

Los estudios de distribución subcelular en ganado ovino del cobre en el hígado (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1989) han contribuido de forma muy importante al esclarecimiento de los mecanismos implicados en la acumulación crónica de cobre en esta víscera. Durante las fases tempranas de acumulación de cobre en el hígado en ovino, al igual que en la mayoría de mamíferos, el cobre se acumula principalmente en el citosol unido a las metalotioneínas; sin embargo, a diferencia de otras especies, la oveja tiene una capacidad limitada para acumular grandes cantidades de cobre-metalotioneína en el hígado y la saturación ocurre muy pronto. Una vez que los sitios de unión para el cobre están saturados se inicia la absorción del cobre por los lisosomas (en la fracción granular). La acumulación en los lisosomas está probablemente relacionada con la autofagia del cobre y está bien asumido que tiene un papel importante en el proceso de detoxificación del cobre para su posterior excreción biliar, si bien hay otras vías para la excreción del cobre aparte de la lisosomal (Bremner, 1998).

El secuestro del exceso de cobre por los lisosomas en proliferación podría ser responsable del mantenimiento de una concentración constante de cobre en el citosol de las células hepáticas (Kumaratilake y Howell, 1989). Al inicio del almacenamiento de cobre en los lisosomas éstos van a aumentar predominantemente en número (de hecho, durante la fase de almacenamiento de cobre en el hígado previa a la hemólisis el número de lisosomas en los hepatocitos está correlacionado positivamente con la concentración de cobre en el hígado). Sin embargo, a medida que la acumulación progresa, el incremento en el número de lisosomas se reduce significativamente (llegando incluso cesar con niveles críticos de cobre) y el exceso de metal es acumulado en los lisosomas ya presentes, dando lugar al aumento de su volumen (Howell y Gooneratne, 1987). Los lisosomas ya existentes podrían llegar a saturarse con lo que el citosol, e incluso el núcleo, no pueden mantener las concentraciones de cobre y comienzan a acumularlo a una velocidad mayor de lo normal, alcanzando valores de toxicidad.

Los lisosomas son por tanto organelas de almacenamiento esenciales que se encargan de proteger la célula hepática de los efectos tóxicos del metal. Mientras los lisosomas son capaces de secuestrar cobre, éste se almacena en el hígado durante un periodo de semanas o meses sin manifestación clínica de daño hepático (Howell y Gooneratne, 1987). Sin embargo, una vez que se saturan los lisosomas, el cobre

comienza a acumularse en concentraciones elevadas en el núcleo y otras organelas, o incluso puede permanecer libre en el citosol, causando en ambos casos importantes lesiones celulares.

El papel de los lisosomas en la capacidad de acumulación de cobre en el hígado, y por tanto, en las diferencias entre las distintas especies animales en cuanto a su susceptibilidad a sufrir procesos de intoxicación crónica, parece estar relacionado con la cantidad de cobre que son capaces de acumular. Los estudios de distribución subhepática de cobre en oveja indican que la fracción granular (que contiene los lisosomas) comienza a alcanzar una fase de meseta a una concentración de cobre en el hígado entre 160 y 180 mg/kg peso fresco, menos de 2 veces por encima de los niveles de cobre adecuados para esta especie (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Saylor and Leach, 1980), mientras que en otras especies menos susceptibles a la intoxicación por cobre, como las ratas, la capacidad de la fracción granular para acumular cobre comienza a saturarse a niveles de cobre entre 210 y 300 mg/kg peso fresco, casi 100 veces por encima de las concentraciones de cobre normales para esta especie animal (Corbett et al., 1978).

Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de necrosis hepática en animales que presentan una acumulación de cobre en el hígado, se ha sugerido que el exceso de acumulación de cobre conlleva la ruptura de las membranas lisosomales, dando lugar a una filtración de hidrolasas ácidas en el citoplasma y la destrucción de las células hepáticas (Gooneratne et al., 1980). Lindquist (1968) sugiere que la ruptura lisosómica ocurriría por oxidación catalítica de la membrana lipídica, que se podría iniciar por la acción directa del cobre con oxígeno formándose radicales libres, aunque es también posible que la acumulación de cobre en la fracción nuclear desestabilice el ADN e inhiba la actividad de la RNA polimerasa, dando lugar a una desorganización y la consecuente muerte de la célula (Bremner, 1998). El aumento de iones de cobre libres en el citosol podría afectar a la actividad enzimática de los microsomas, causando la peroxidación lipídica de las membranas y la degeneración y necrosis de las células (Kumaratilake y Howell, 1989).

III.2. Cuadro clínico

Las manifestaciones clínicas en la intoxicación crónica por cobre están bien documentadas y se agrupan en tres fases distintas: prehemolítica, hemolítica y posthemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

Durante la fase prehemolítica el cobre se acumula en el organismo, particularmente en el hígado, como hemos indicado. Esta fase puede durar de semanas a meses, tiempo en el que el animal se encuentra clínicamente normal.

La fase hemolítica es la fase clínica. Una vez que se ha superado la capacidad de almacenamiento de cobre en el hígado se produce un intenso daño hepático con la consiguiente salida del metal almacenado en los hepatocitos a la circulación sanguínea, lo que origina el repentino desarrollo de una hemólisis. Lo característico de esta fase es la hemólisis, por lo que normalmente se hace referencia a ella como “crisis hemolítica”. La gravedad de la hemólisis va a condicionar el pronóstico del animal, así, aquellos casos con hemólisis ligeras suelen superar la enfermedad, mientras que los que presenten una hemólisis severa mueren a las pocas horas. Los síntomas clínicos en los animales van a ser los característicos de una anemia hemolítica incluyendo letargia, polidipsia y pérdida de apetito; las mucosas aparecen ictéricas, los ojos hundidos y los vasos de la esclerótica color marrón chocolate por la metahemoglobina. La orina es de color oscuro.

Los animales que sobreviven pasan a la fase posthemolítica. Durante este periodo pueden aparecer nuevas crisis hemolíticas, incluso después de que la fuente de cobre haya sido eliminada. El animal recobra la normalidad, si bien la recuperación es tanto más lenta cuanto más intensa haya sido la fase hemolítica.

III.2.1. Cambios en hígado

En la intoxicación crónica por cobre los hepatocitos muestran un gran número de lisosomas cargados de cobre y se presume que la carga excesiva precede a la muerte individual de los mismos (Howell y Kumaratilake, 1985).

Durante el periodo prehemolítico se ha demostrado mediante estudios morfológicos un gran aumento en el número de lisosomas que acumulan más cobre, aumentan en tamaño y presumiblemente en peso. A nivel ultraestructural, muchos hepatocitos muestran un aumento marcado en número, tamaño y densidad de los lisosomas que eran normales en otras situaciones. Algunos de estos lisosomas mostraron interrupciones focales de sus membranas, lo que se asocia a liberación de material granular (Gooneratne et al., 1980). Estudios morfológicos ponen de manifiesto que la acumulación de cobre en los lisosomas comienza en la zona periportal, aunque en alguna raza como la Merina, el cobre comienza a acumularse en la zona de las venas centrales y a medida que progresa la acumulación se extiende a las zonas medias y periféricas de los lóbulos (zona periportal). La distribución de las células hepáticas que sufren necrosis no sigue este patrón y dichas células se distribuyen de forma aleatoria a lo largo de los lóbulos hepáticos cargados de cobre. El examen de secciones de hígados de animales que se encuentran en la fase prehemolítica pone de manifiesto la existencia de células vacuolizadas y numerosas células de Kupffer con una elevada actividad fosfatasa ácida (Howell y Gooneratne, 1987).

El hígado de los animales que mueren o son sacrificados durante la fase hemolítica contienen también un número elevado de células parenquimatosas necróticas, las

cuales se sitúan sobre todo alrededor de las venas centrales, además de focos de neutrófilos, depósitos de bilis, y un número elevado de células de Kupffer, Se observan además densos depósitos granulares de cobre tanto en las células parenquimatosas como en las células de Kupffer, así como un gran número de estas últimas alrededor de las zonas centrolobulillares (Howell y Gooneratne, 1985).

III.2.2. Cambios en sangre

El aumento de la concentración de cobre en sangre se debe a la ruptura de los lisosomas hepáticos y liberación enzimática desde el hígado. El cobre procedente de la lisis de los hepatocitos cargados de cobre pasa a la sangre dando lugar a una crisis hemolítica.

El mecanismo que desencadena la absorción del cobre por los eritrocitos 24 horas antes de la hemólisis no está claro, pero podría ser debido a una deformación de sus membranas por efectos indirectos o directos del cobre, dando lugar a cuerpos de Heinz y/o sobre componentes como la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa, glutatión y adenosina-trifosfato. Durante la acumulación de cobre hay un aumento de la actividad simultánea de fosfatasa ácida y sorbitol deshidrogenasa a parte del cobre en sangre.

Kumaratilake et al. (1981) encontraron mínimas fluctuaciones de cobre en sangre, plasma y glóbulos rojos hasta un poco antes de la hemólisis, momento en el que los valores eran de 4 a 10 veces superiores a lo normal. Tras muestreos diarios de sangre en ovejas en fase de acumulación de cobre (prehemolítica) se observó que los niveles de cobre, tanto en sangre entera como en plasma, eran elevados en periodos cortos de tiempo durante las 14 semanas previas a la hemólisis, aunque los aumentos eran de mayor intensidad 1 o 2 días o incluso el primer día de la hemólisis. En base a esto, concluyeron que las estimaciones de los niveles de cobre en sangre tienen una validez limitada para el diagnóstico de la acumulación o intoxicación con cobre.

Otros cambios bioquímicos en sangre están asociados al daño hepático, uno de los más tempranos en la fase prehemolítica es el aumento de la actividad de enzimas hepáticas que son específicas como sorbitol-deshidrogenasa, arginasa o glutamato-deshidrogenasa, ésta última es considerada por algunos autores como el mejor indicador para el diagnóstico de la intoxicación crónica de cobre por sus aumentos significativos (Humann-Ziehank et al., 2001). La mayor parte de estos aumentos se correlacionan con la actividad de la fosfatasa ácida y con los máximos niveles de cobre plasmático indicando así la liberación del contenido de los lisosomas hepáticos (organelas que acumulan cobre) en el transcurso de la enfermedad. En otros estudios la actividad de fosfatasa ácida en suero permaneció aumentada durante la fase prehemolítica en todas las ovejas (Spengler, 1989).

III.2.3. Cambios en el riñón

Durante la fase pre-hemolítica de la intoxicación crónica por cobre, el metal se acumula sin que el riñón pierda su función y presente únicamente mínimos daños estructurales (Howell y Gooneratne, 1987; Ledoux et al., 1996).

Durante la hemólisis la asociación de cobre y hierro contenidos en el riñón es bastante marcada generando una incapacidad glomerular y tubular. En cuanto a la patogenia no está claro el mecanismo responsable de los cambios degenerativos y necróticos: la ruptura de los lisosomas que liberan cobre, el cobre unido a metalotioneínas, o simplemente las metalotioneínas, todos ellos tienen un carácter citotóxico pudiendo dar lugar a una desorganización de la célula. Los mecanismos fisiopatológicos son posiblemente similares a los que afectan al parénquima hepático.

En el transcurso de la fase posthemolítica tanto la actividad enzimática como las células sanguíneas antes mencionadas regresan a la normalidad, sin embargo existen evidencias de fallo renal representado por los niveles de urea elevados.

III.3. Acumulación subclínica de cobre en el hígado

Como ya se ha indicado, en la intoxicación crónica por cobre previa a la crisis hemolítica hay una fase, más o menos prolongada de tiempo, en la que se produce la acumulación de cobre en el hígado (Weaver et al., 1999); solamente cuando se sobrepasa esta capacidad de almacenamiento es cuando ocurre la rotura de los hepatocitos cargados de cobre que da lugar a la hemólisis masiva. Teniendo en cuenta la patogenia de la toxicidad crónica de cobre es fácil entender que durante la fase silente de almacenamiento (fase prehemolítica) ocurran pequeños daños hepáticos, medibles a nivel laboratorial (utilizando marcadores enzimáticos de daño hepático), pero que pasan desapercibidos desde un punto de vista clínico. Estas lesiones pueden ser responsables de un menor rendimiento de los animales, o lo que es lo mismo, de toxicidad subclínica.

La acumulación de cobre en hígado en ganado vacuno, junto con la toxicidad subclínica derivada de la misma, es un tema de gran actualidad. Estudios de monitorización del estatus de cobre llevados a cabo en diversos países en los últimos años (Hadrach, 1996; Jilg et al., 1997; López Alonso et al., 2000b) ponen de manifiesto que un porcentaje relativamente alto de animales presenta niveles de cobre por encima de los límites fisiológicos, lo que indica un riesgo potencial de toxicidad. Al igual que en los casos de toxicidad clínica, la causa de esta acumulación subclínica se sitúa en el empleo de suplementos de cobre, especialmente en alimentos compuestos, por encima de las necesidades fisiológicas (Engle y Spears, 2000a). También se ha descrito un aumento significativo de los niveles de cobre en

animales procedentes de regiones agrícolas donde la densidad de ganado porcino es elevada, y si bien los autores señalan que no suceden episodios de toxicidad clínica, podrían ser responsables de una merma en las producciones.

A modo de ejemplo podemos señalar varios estudios experimentales donde, a pesar de no inducir toxicidad clínica, el almacenamiento crónico de cobre a nivel hepático en ganado vacuno es responsable de una merma de las producciones.

Gummow (1996) de forma experimental indujo una intoxicación por cobre en ganado vacuno adulto administrando suplementos de cobre durante largos periodos de tiempo. Los resultados de su estudio permitieron establecer que en las condiciones de sus experimentos aparecen daños subclínicos tras la administración oral de dosis iguales o superiores a 12 mg/kg de peso de cobre al día, una concentración comúnmente empleada en programas de suplementación de cobre en ganado vacuno. Durante el curso de la prueba se monitorizaron las concentraciones de gamma-glutamilttransferasa (GGT) y aspartato aminotransferasa (ASAT), BUN (nitrógeno ureico), cobre plasmático, concentraciones de zinc y hierro. Los resultados de ASAT muestran que los animales que reciben 10 mg de cobre al día presentaban un daño hepático que llegó a ser detectado sobre el día 40 y persistió durante la prueba, el patrón del daño hepático cobra interés por los picos que aparecen cada 80 días, a los que se interponen periodos de actividad enzimática normal. Se postuló que este patrón puede reflejar episodios de daño celular severo, en el que los hepatocitos de forma individual son destruidos y sustituidos por tejido fibroso no activo. El resultado es una decadencia de la masa funcional y la aparente normalización de la actividad enzimática. Los resultados de ASAT podrían reflejar también que no todos los hepatocitos acumulan cobre al mismo tiempo y la misma cantidad, causando el daño antes en unas células que en otras. Cuando se examinó la concentración del cobre plasmático se observó que en los grupos que recibían 10 y 20 mg/kg de cobre al día los valores encontrados eran significativamente altos en comparación con los controles; estos resultados indican que cuando ocurre la lisis celular el cobre se libera desde las células dañadas, dando lugar a un aumento significativo de los niveles de cobre en sangre en los animales clínicamente normales.

Jenkins y Hidioglou (1989) realizaron un experimento en terneros lactantes a los que se les suplementó cobre en distintas concentraciones (entre 10 y 500 mg/kg) con el fin de estimar la concentración de metal que podría afectar al rendimiento de los animales. Tras el tratamiento observaron que tanto el peso del ganado como la eficiencia de la dieta fueron similares en los grupos que recibían 10 y 50 mg/kg, pero la ganancia de peso mermaba significativamente en los grupos que recibieron entre 200 y 500 mg/kg. El suplemento adicional de 1000 mg/kg de zinc previene las muertes para 1000 mg/kg de cobre pero el rendimiento de los terneros es pobre. Encontraron que con 50 mg/kg de cobre se conseguía una ingesta segura con

lactoreemplazante que contenía 48 mg/kg de zinc y 1,1 mg/kg de molibdeno, sin embargo, en ingestas inferiores de estos elementos o durante periodos superiores a 6 semanas, los terneros podrían ser más susceptibles a la intoxicación por cobre. Los niveles plasmáticos de aspartato aminotransferasa, indicativos de necrosis hepática, fueron similares y se mantuvieron dentro de los valores de referencia para los animales de los lotes que recibían 10, 50 y 200 mg/kg de cobre, aunque fueron elevados para 500 mg/kg de cobre y para los lotes de 1000 mg/kg de cobre más 1000 mg/kg de zinc. Durante el examen postmortem ninguno de los terneros que recibían 10, 50, o 200 mg/kg de cobre mostraron grandes anormalidades. En definitiva, los terneros alimentados con lactoreemplazantes toleraron hasta 50 mg/kg de cobre, mientras que niveles de 200 y 500 mg/kg fueron tóxicos y causaron menor rendimiento y eficiencia del alimento; con un nivel de suplementación de 1000 mg/kg 3 de 7 terneros murieron, si bien con la adición de zinc a este suplemento se previnieron las muertes aunque disminuyó su rendimiento.

Engle y Spears (2000b) realizaron un estudio sobre el efecto del cobre dietético sobre el metabolismo lipídico, fermentación ruminal y rendimiento de los animales. Para ello se contó con un grupo control, y con 2 grupos a los que se le suplementó 10 y 20 mg de cobre (como CuSO_4)/kg peso seco. Se observó una correlación positiva entre el nivel de suplementación y los niveles de cobre en el hígado, mientras la concentración de colesterol total en suero se redujo. Durante la fase de acabado, la suplementación de cobre reduce la ganancia de peso, la ingesta de alimento, y el índice de conversión (consumo alimento/ganancia peso), sin tener en cuenta la concentración ni fuente de cobre. La disminución del rendimiento puede ser debido a un alto nivel de cobre en la dieta que es capaz de alterar la fermentación ruminal (Engle y Spears., 2000a).

La toxicidad subclínica de cobre es un tema de gran actualidad, puesto que estudios de monitorización del estatus de cobre llevados a cabo en diversos países (Hadrich, 1996; Jilg et al., 1997) ponen de manifiesto que un porcentaje relativamente alto de animales presenta niveles de cobre por encima de los límites fisiológicos, lo que indica un riesgo potencial de toxicidad. Al igual que en los casos de toxicidad clínica, la causa de esta acumulación subclínica se sitúa en el empleo de suplementos de cobre, especialmente en alimentos compuestos, por encima de las necesidades fisiológicas (Engle y Spears, 2000a). También se ha descrito un aumento significativo de los niveles de cobre en animales procedentes de regiones agrícolas donde la densidad de ganado porcino es elevada, y si bien los autores señalan que no suceden episodios de toxicidad clínica, podrían ser responsables de una merma en las producciones.

IV. Parámetros para valorar el estatus de cobre

El estatus mineral en los animales depende del mantenimiento de una relación suelo-planta-animal (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001) y si alguno de estos tres niveles se encuentra afectado, la salud, y en consecuencia el rendimiento de los animales, se verán alterados de manera equivalente.

En general, debemos tener en cuenta que en los desordenes minerales los resultados de los test de diagnóstico ofertan suficiente información para guiar la clínica de forma correcta, aunque en muchos casos los protocolos requieren múltiples pruebas incluyendo la dosis del elemento en varios compartimentos y la valoración de otros parámetros bioquímicos. El examen del estatus de un mineral debe orientarse hacia la prevención, debe incluir una anamnesis con datos de presumible importancia como son la producción y la reproducción, un examen físico que valore los distintos estados fisiológicos en los que se pueden encontrar los animales, una analítica de muestras de fluidos y tejidos, así como un examen patológico de muestras en caso de que se lleven a cabo necropsias (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). Debemos tener en cuenta en primer lugar si existen síntomas clínicos o subclínicos de pérdida de producción, si desde el punto de vista bioquímico observamos concentraciones anormales del mineral en tejidos y en sangre y si existen diferencias entre los animales en relación a un tratamiento con o sin cobre.

Dentro del programa de diagnóstico de deficiencia de cobre deberá conocerse el nivel del mineral de los suelos, hacer una revisión de la dieta (sin olvidarse de las premezclas minerales) para así conocer el aporte de cada elemento, y por supuesto, si queremos conocer el estatus de cada elemento en el organismo, habrá que realizar los análisis oportunos (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001). En lo que se refiere a la dieta, deberemos ir más allá, profundizando en el estudio de posibles interferencias con otros de sus componentes, requerimientos mayores que puede tener el animal por encontrarse en alguna fase de variación fisiológica o por excesos de eliminación. Desde un punto de vista profiláctico resulta de gran utilidad realizar un estudio con carácter anual del estatus mineral a nivel del conjunto de la explotación. Si nos encontramos con problemas clínicos es necesario repetir el estudio del ciclo suelo-planta-animal (Quiroz-Rocha y Bouda, 2001); debe tenerse en cuenta además otros factores de variación como pueden ser los cambios estacionales, ya que van a influir en la disponibilidad de los elementos.

A la hora de realizar el diagnóstico de la intoxicación por cobre debemos de tener en cuenta además de las características clínicas del animal, la historia de exposición al metal, la predisposición genética, los cambios morfológicos y bioquímicos y el análisis del contenido de cobre en la dieta, tejidos y sangre. El no considerar en

conjunto todos estos datos puede hacer que el diagnóstico resulte dificultoso (Underwood y Suttle, 2002).

Como hemos comentado, previo a la manifestación clínica de la intoxicación por cobre existe una fase de almacenamiento en el hígado en el que pueden ocurrir daños subclínicos en el animal, responsables de un menor crecimiento o merma en las producciones, que es importante identificar.

IV.1. Cobre dietético y sus antagonistas

La determinación de las concentraciones de cobre en la ración o en los pastos no tiene valor diagnóstico a no ser que se determinen también otros elementos que interaccionan con él. En este sentido, la determinación de las concentraciones de molibdeno es uno de los criterios más usados para diagnosticar la deficiencia secundaria de cobre y predecir su riesgo según un cociente Cu:Mo determinado. A pesar de conocerse el efecto de la relación Cu:Mo sobre las deficiencias o toxicidades del cobre, no se sabe donde está el límite crítico de este cociente. Miltimore y Manson (1971) constatan que un cociente Cu:Mo dietético inferior a 2:1 puede condicionar una deficiencia de cobre en el ganado vacuno, mientras que Alloway (1973) considera que es necesario un cociente de casi 4:1 para evitar ataxia neonatal en ovejas.

Se han dado distintas razones por las que el cociente Cu:Mo no es un buen indicador de los desórdenes del cobre. En primer lugar no refleja la ingestión previa de cobre absorbible y tampoco tiene en cuenta las reservas de cobre en el hígado. Además, este parámetro no muestra la influencia del azufre, ya que los cocientes Cu:Mo son menos importantes a medida que el azufre vegetal aumenta. Por otro lado, la fuerza del molibdeno en la interacción con el cobre es diferente en el caso de la hierba, heno o ensilado y se podría decir que varía estacionalmente en una línea vegetal determinada; su efecto inhibitor sobre la disponibilidad de cobre puede revertirse a elevadas concentraciones del mismo (Suttle, 1983a) y también pueden influir otros antagonistas como el hierro. Por tanto, esta medida diagnóstica debe, al igual que otras, tomarse de manera flexible a la hora de su interpretación. Así, ante cocientes Cu:Mo <1,0 hablaríamos de un riesgo elevado de alteración y entre 1,0-3,0 de un riesgo marginal de problemas de deficiencia en el pasado o que pueden aparecer en meses posteriores.

IV.2. Cobre en hígado

La concentración de cobre hepático es el indicador más sensible del nivel de exposición de cobre en la dieta en rumiantes (Gooneratne et al., 1989a; Suttle y

Underwood, 2002). Aproximadamente el 50-60% del cobre total del organismo está almacenado en el hígado, así que las variaciones en este órgano son un buen indicador del estatus de cobre del animal. La principal limitación en su empleo es la obtención de la muestra, así, los tejidos obtenidos a la hora del sacrificio podrían no ser oportunos con el propósito de monitorizar el estatus de un rebaño, y las biopsias son a menudo invasivas y difíciles de conseguir.

Cabe citar como factores influyentes en la concentración de cobre en el hígado la especie, edad, composición química en la dieta, así como diversas situaciones de enfermedad, en el siguiente apartado discutiremos en detalle los factores de variación.

- Especie: las diferencias interespecíficas no tienen nada que ver con la ingesta de cobre, sino que están relacionadas con los patrones de excreción. En animales no rumiantes se citan niveles de 10-50 mg/kg de cobre en materia seca (de ellos la inmensa mayoría se encuentran comprendidos entre 15-30 mg/kg) mientras en rumiantes se alcanzan valores de 100-400 mg/kg materia seca. Ovejas y vacas tienen una capacidad superior para unir cobre en hígado así como una menor capacidad de excreción (Charmley y Symonds, 1985). Los niveles sanguíneos de cobre no aumentan en estas especies ante aumentos en la ingesta (a diferencia de otras como las ratas) a no ser que sean excesivos, momento en el cual en rumiantes sí se puede sobrepasar la capacidad de fijación en el hígado con un aumento consecuente de los niveles de cobre en sangre (Charmley y Simonds, 1985; Arnhold et al., 1998 a,b).
- Raza: a la hora de considerar este parámetro no debemos olvidar que existen diferencias raciales en cuanto a los depósitos corporales de cobre. Du et al. (1996) sugieren que el vacuno Holstein tiene un umbral hepático inferior que el Jersey en el mantenimiento normal de las concentraciones plasmáticas de cobre y en Aberdeen Angus los casos que respondían a cobre sólo se diferenciaban por valores hepáticos inferiores a 3 mg Cu /kg materia seca.
- Edad: en relación a la edad, los neonatos de la mayoría de las especies (incluidos los humanos) presentan valores de cobre hepáticos más altos que los encontrados en animales adultos. La excepción la constituyen los rumiantes, así, en ovejas los valores en neonatos son más bajos que en adultos y la concentración de cobre va aumentando de forma progresiva con la edad, mientras que en terneros son comparables con los encontrados en adultos.
- Dieta: el almacén de cobre en el hígado de ovejas y vacas puede reducirse significativamente por un aumento en la dieta de molibdeno y azufre (Woolliams et al., 1983; Suttle, 1983b). La retención de cobre en el hígado

está también influenciada por los niveles de zinc, cadmio, carbonato cálcico e hierro en la dieta (Bremner y Beattie, 1995).

- Otras enfermedades: se ha observado una depleción de cobre en ratas como resultado de una infección de carácter agudo o crónico. Esto es debido a la elevación de la síntesis y secreción de ceruloplasmina por el hígado (Beisel et al., 1974).

En los primeros estudios que se hicieron en corderos y terneros recién destetados se consideraron como indicativos de una deficiencia, ya sea simple o condicionada, valores de cobre hepático de 20-25 mg/kg materia seca. Más tarde se sugirió que el umbral que debía utilizarse para diferenciar animales alterados/normales era un 75% menor (Suttle, 1987).

Underwood y Suttle (2002) recomiendan una clasificación a tres niveles: valores de cobre inferiores a 6 mg/kg materia seca indican un riesgo elevado de deficiencia, entre 6-20 mg/kg un riesgo de alteración en el pasado o futuro en el campo, y por encima de 20 mg/kg los niveles de cobre se consideran adecuados. Puls (1994) establece un rango de deficiencia entre 0,5-10,0 mg/kg peso fresco, de marginal entre 5,0-25,0 mg/kg y adecuado por encima de 25,0 mg/kg.

La concentración de cobre en el hígado elevada es uno de los parámetros más importantes a la hora del diagnóstico de intoxicación ya que hasta que se desencadena la crisis hemolítica el cobre se acumula casi exclusivamente en este órgano (Howell y Gooneratne, 1987).

En ganado ovino, especie muy susceptible a la intoxicación crónica por cobre, se establece el umbral de toxicidad en 150 mg/kg peso fresco (Underwood y Suttle, 2002). No obstante, en la mayor parte de los casos los niveles medidos superan las 500 mg/kg o incluso los 1000 mg/kg peso fresco. Esta gran variabilidad, en cuanto a la capacidad de almacenamiento que los animales pueden tolerar, se asume que puede estar condicionada por la aparición de factores estresantes (como el frío o el esquilado) que precipitan la necrosis de los hepatocitos cargados de cobre, y por tanto la aparición de la crisis hemolítica.

A diferencia del ganado ovino, y al igual que sucedía con los niveles de cobre en hígado indicativos de deficiencia, los niveles de residuo asociados con toxicidad en ganado vacuno no están claramente establecidos. Aunque de forma tradicional se establecía un umbral de toxicidad para esta especie animal en 250 mg/kg peso fresco (Wikse et al., 1992; Radostits et al., 2002), de forma reciente se han descrito casos de intoxicación crónica en animales donde los niveles de cobre exceden los 150 mg/kg. Así por ejemplo, en un estudio de inducción experimental de intoxicación por cobre en vacuno adulto se observaron signos clínicos de intoxicación en los animales con una concentración media de cobre en el hígado de $152 \pm 56,6$ mg/kg peso fresco

(rango: 69-194 mg/kg) (Gummow, 1996). De igual forma, Perrin et al. (1990) describen como en un episodio de intoxicación crónica de cobre en un rebaño de ganado vacuno de leche como consecuencia de un error en la formulación del suplemento mineral del pienso, la concentración media de cobre en hígado de los animales que murieron fue de $126 \pm 17,5$ mg/kg peso fresco (rango: 51-313 mg/kg).

También hay que tener en cuenta que cuando se supera la capacidad de almacenamiento de cobre en hígado y se produce la necrosis de los hepatocitos cargados de cobre, este metal pasa a la circulación sanguínea (desarrollando la crisis hemolítica), por lo que en ese momento los niveles de cobre pueden ser más bajos.

IV.3. Cobre en riñón

La determinación de los niveles de cobre en riñón presenta importancia para confirmar el diagnóstico de intoxicación en los animales que muestren niveles de cobre próximos al umbral de toxicidad. Si bien las concentraciones renales de cobre permanecen próximas a la normalidad (4-6 mg/kg peso fresco; Puls, 1994) durante la fase de almacenamiento, una vez que ésta se satura y se produce la crisis hemolítica, una gran parte del cobre liberado pasa al riñón donde se acumula (Riet-Correa et al., 1989). Así, en un estudio sobre el diagnóstico de la intoxicación de cobre en terneros, se registraron valores en hígado y riñón de 36-166 mg/kg y 22-35 mg/kg respectivamente (Sargison y Scott, 1996), lo que llevó a los autores a concluir que concentraciones de cobre renales elevadas confirman el diagnóstico provisional de intoxicación, mientras que las concentraciones normales hepáticas eran la consecuencia de la previa liberación del cobre almacenado en los lisosomas hacia la circulación periférica.

Además, junto con los niveles de cobre es importante considerar las concentraciones renales de hierro, que permanecerán normales o ligeramente elevadas antes de la crisis hemolítica mientras que estarán muy aumentadas durante y después de la fase hemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

IV.4. Cobre plasmático y sérico

La concentración de cobre en plasma o suero es uno de los parámetros más utilizados para establecer el estatus de cobre en un animal; a ello contribuye el que se trate de una muestra fácil de recoger y que pueda ser procesada de forma rutinaria por muchos laboratorios (Tessman et al., 2001; Minatel y Carfagnini, 2002).

Los niveles normales de cobre en plasma son amplios y varían entre especies; además dependen de la edad, tipo de muestra, estado fisiológico (gestación) y del padecimiento de otras enfermedades. En mamíferos recién nacidos, los valores

normales son más o menos un 50% de los valores en el adulto pero aumentan al hacerlo su componente mayoritario que es la ceruloplasmina (McMurray, 1980).

En muestras de animales adultos debemos tener en cuenta que los valores en suero son entre un 10-20% inferiores a los correspondientes en plasma y esto es debido a que parte del contenido en ceruloplasmina se pierde con la coagulación (McMurray, 1980; Paynter, 1980; Suttle, 1994). Para convertir valores de cobre en suero a plasma se multiplica por 1,200 y se resta 0,032 (Wikse et al., 1992).

Las enfermedades infecciosas y otros factores que estimulan el sistema inmune, especialmente la vacunación, aumentan sustancialmente los niveles de cobre en sangre puesto que inducen la síntesis de ceruloplasmina, incluso en animales inicialmente hipocuprémicos (Suttle, 1994), esta falta de especificidad probablemente haya contribuido al escaso interés del cobre sérico como ayuda diagnóstica en comparación con el cobre hepático (Xin et al., 1993; Vermunt y West, 1994). Sin embargo, determinar la hipocupremia es una ayuda importante para el diagnóstico ya que es un indicativo de que las reservas hepáticas están agotadas, y que por tanto puede verse comprometida la síntesis de ceruloplasmina, principal exportador de cobre a los tejidos.

La mayor limitación del uso del cobre plasmático y ceruloplasmina como indicadores del estatus de cobre es que existe un intervalo de tiempo muy variable entre el descenso de sus niveles y el desarrollo de los cambios patológicos, aunque las indicaciones son que los intervalos son más cortos en animales jóvenes.

Las concentraciones de cobre en suero o plasma podrían resultar “falsos positivos” cuando las dietas son altas en molibdeno. Esto es debido a que el cobre en sangre está ligado a tiomolibdatos, lo que lo hace no disponible para el metabolismo normal (Wikse et al., 1992). De esta forma se han visto respuestas positivas a la suplementación por cobre en corderos normocuprémicos que pastaban en zonas ricas en molibdeno, al igual que signos de deficiencia en terneros que recibían dietas altas de molibdeno de forma experimental y que presentaban niveles de cobre en suero dentro del rango de normalidad (Underwood y Suttle, 2002).

Al igual que sucede con los niveles de cobre en hígado, no es fácil establecer un umbral indicativo de deficiencia para los niveles de cobre en plasma, puesto que como hemos indicado, va a verse condicionado por distintos factores, entre ellos los que estimulan la síntesis de ceruloplasmina. En general se admite que niveles de cobre en plasma permanentemente por debajo de 0,5 mg/l pueden ser indicativos de deficiencia (Radostits et al., 2002). No obstante, tanto en ganado vacuno como en ovino con manifestaciones clínicas de deficiencia de cobre suelen encontrarse concentraciones plasmáticas entre 0,2-0,3 mg/l (McFarlane et al., 1991; Underwood y Suttle, 2002).

IV.5. Cobre sanguíneo

La concentración de cobre en sangre total no se ha empleado de forma rutinaria para el diagnóstico de deficiencias de cobre, aunque sí se ha revelado como un parámetro útil en los casos de intoxicaciones.

En este sentido, Inglaterra ha sido posiblemente el único país donde se ha utilizado con frecuencia este parámetro en el diagnóstico de las deficiencias de cobre, fijándose en principio un umbral máximo de normalidad en 0.80 mg/l; no obstante, se ha demostrado que al igual que sucedió en un principio con los niveles de cobre en hígado, este valor es demasiado alto, lo que llevó a sobreestimar la incidencia de hipocuprosis (Suttle, 1994) puesto que muchos animales no se beneficiaban de la suplementación (Givens et al., 1981).

Estudios posteriores, como los llevados a cabo por Koh y Judson (1987), en los que determinaron las concentraciones de cobre en plasma, sangre total e hígado en los mismos individuos durante espacios de tiempo prolongados, permitieron establecer un intervalo marginal de 0.38-0.63 mg/l de cobre en sangre entera.

La determinación de los niveles de cobre en sangre presenta una utilidad diagnóstica limitada en la identificación de los animales que se encuentren en la fase de acumulación de cobre a nivel hepático (fase prehemolítica), puesto que éstos permanecen dentro del rango de normalidad mientras no se supere la capacidad de almacenamiento, y únicamente sufren una elevación considerable cuando ocurre la crisis hemolítica (Howell y Gooneratne, 1987).

Al igual que sucede en el diagnóstico de la deficiencia de cobre, los niveles de cobre en suero o plasma se han usado con más frecuencia que la concentración del metal en sangre entera. En general, se asume que concentraciones por encima de 3 mg/l son indicativas de intoxicación por cobre (Bidewell et al., 2000).

IV.6. Ceruloplasmina

La actividad de la ceruloplasmina, el principal exportador de cobre hepático hacia los tejidos, se considera un buen indicador del estatus de cobre en vacuno (Blackley y Hamilton, 1985; Barboza y Blake, 2001). Así, si las concentraciones de cobre caen por debajo de 0,3 mg/l en sangre y 40 mg/kg en el hígado, la actividad de ceruloplasmina estará significativamente disminuida (Hynes et al., 1975; Larson et al., 1995; Arthington et al., 1996).

Wikse et al. (1992) señalan como importante ventaja de la ceruloplasmina el que es mucho más precisa que la concentración de cobre en sangre para identificar problemas de deficiencia de cobre ligados a un exceso de molibdeno en la dieta, debido a que cuantifica únicamente el cobre fisiológicamente disponible.

Sin embargo, en el resto de los casos, las ventajas que aporta la determinación de la actividad de la ceruloplasmina en comparación con el cobre sanguíneo en rumiantes son pocas, ya que las correlaciones de estos dos parámetros suelen ser muy altas puesto que el 80-90% del cobre se encuentra en forma de ceruloplasmina.

Los rangos de referencia para la ceruloplasmina en plasma se sitúan entre 10 y 20 mg/dl para animales con un estatus de cobre adecuado, entre 5 y 10 mg/dl como indicativos de deficiencia y < 5 mg/dl en casos de deficiencia severa (Gay et al., 1988).

IV.7. Cu-Zn-Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la Cu-Zn superóxido dismutasa en los eritrocitos, una de las principales cuproenzimas, constituye un método indirecto para valorar el estatus de cobre en animales. Comparando la actividad SOD con la concentración hepática de cobre se llegó a la conclusión de que sirve para predecir los niveles de cobre en hígado en ovejas cuando la ingesta es de baja a moderada (Underwood y Suttle, 2002).

La actividad de SOD en los eritrocitos va a ayudar al diagnóstico de forma distinta que los niveles de cobre plasmático o sérico, ya que ante una deficiencia de cobre la actividad enzimática va a descender a un ritmo lineal y lento (Suttle y McMurray, 1983). Así, frente al descenso de manera exponencial del cobre plasmático o sérico los valores bajos de SOD nos señalan una deficiencia prolongada de cobre y los valores altos una sobrecarga del mismo que se relacionan más con la tasa de crecimiento que con el contenido de ceruloplasmina.

Debe tenerse en cuenta que las unidades convencionales de medida no son cuantitativas, utilizando como unidad la actividad necesaria para alterar en un 50% la tasa de “superoxidación”. Como las tasas de superperoxidación varían según el método, la equivalencia molecular de SOD de una unidad también varía. Además, los glóbulos rojos deben lavarse para eliminar los inhibidores plasmáticos y diluirse para minimizar la interferencia de los constituyentes de los hematíes, incluyendo probablemente la hemoglobina. Se han propuesto intervalos específicos para ensayos particulares (Herbert et al., 1991). Gracias a que la actividad de SOD está correlacionada de forma importante con el cobre eritrocitario, la medición del cobre en los glóbulos rojos sería más útil y menos problemática (Arthington et al., 1996).

IV.8. Biomarcadores de acumulación hepática de cobre

En la actualidad, los medios diagnósticos disponibles para la identificación de los animales que sufren una intoxicación por cobre son únicamente válidos para la fase clínica de la enfermedad, en la que ha ocurrido un importante daño orgánico.

Hay por tanto una clara necesidad de identificar nuevos marcadores sensibles a cambios tempranos, con la capacidad de predecir riesgo de acumulación de cobre a nivel hepático, antes de que aparezcan las alteraciones funcionales características de la intoxicación crónica de cobre.

En un intento por encontrar marcadores potenciales de la exposición a niveles elevados de cobre, y teniendo en cuenta que la ceruloplasmina, principal componente del cobre en la sangre, puede verse afectada por multitud de factores a parte de la exposición a cobre, la fracción no-ceruloplasmina (como un valor calculado) se ha usado de forma reciente como marcador de exposición a cobre en la especie humana (Eife et al., 1999; Araya et al., 2003; López-Alonso et al., 2006). Así, se ha demostrado que la fracción no-ceruloplasmina de cobre en el suero está positivamente correlacionada con los niveles de cobre en el suero tanto en pacientes que reciben niveles altos de cobre en la dieta como en aquellos que presentan alteraciones en el metabolismo del cobre que dan lugar a altos depósitos de cobre en el hígado (como por ejemplo en la enfermedad de Wilson o en otras formas de cirrosis en niños).

El ratio actividad ceruloplasmina frente al cobre sérico también se ha empleado como herramienta en el diagnóstico de deficiencia de cobre en rumiantes (Mackencie et al., 1997; Arnhold et al., 1998a), permitiendo incluso valorar la interferencia de niveles elevados de molibdeno sobre el estatus de cobre. No obstante se desconoce la utilidad de este parámetro como posible indicador de la acumulación de cobre en rumiantes.

Finalmente, señalar que nuevos estudios realizados en medicina humana apuntan la posibilidad del empleo de ciertas proteínas eritrocitarias como marcadores de exposición a niveles elevados de cobre (Speisky et al., 2003), basándose en el hecho de que el cobre es capaz de fijarse con una gran afinidad a ciertas proteínas presentes en los eritrocitos.

IV.9. Enzimas marcadoras de daño hepático

La determinación de ciertas enzimas marcadoras de daño hepático permite evaluar el grado de necrosis celular una vez que los hepatocitos saturados de cobre sufren la lisis celular.

Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de identificar cuáles son los indicadores bioquímicos más adecuados para el diagnóstico de intoxicación por cobre en rumiantes. Entre ellas las más empleadas han sido la aspartato-aminotransferasa que se libera normalmente en respuesta a cambios en la permeabilidad hepatocelular, daño subletal y necrosis (Bakley et al., 1982) y la gamma-glutamyl-transferasa que está asociada con membranas microsomales y se suele liberar durante la necrosis letal celular (van der Schee et al., 1983; Humphries, 1989; Lewis et al., 1997). También se han empleado otras enzimas específicas hepáticas como la arginasa, sorbitol deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa además de enzimas lisosomales como la fostatasa ácida (Zervas et al., 1990; Sutherland et al., 1992).

Los resultados de estos estudios son bastante inconsistentes, tanto en lo relacionado a la sensibilidad de los parámetros como en la correlación existente entre el daño hepático y la magnitud en la elevación de sus niveles plasmáticos. Algunos estudios muestran que las actividades de las enzimas tan sólo se elevan al comienzo de la crisis hemolítica, por lo tanto no son realmente técnicas diagnósticas válidas (Humann-Ziehank et al., 2001). Duncan y Prasse (1986) documentaron además que la correlación entre la actividad sérica de la enzima aspartato-aminotransferasa y la manifestación clínica de la insuficiencia hepática es pobre.

IV.10. Hematología

Durante la fase clínica de intoxicación por cobre el estudio hematológico pone de manifiesto un marcado descenso del número de glóbulos rojos, del valor hematócrito y de la hemoglobina asociado a la hemólisis masiva que puede afectar hasta al 75% de los eritrocitos. El examen del frotis sanguíneo en la fase hemolítica revela la existencia de numerosos fragmentos celulares, anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia y presencia de cuerpos de Heinz en más del 15% de los eritrocitos. Los glóbulos blancos estarán muy aumentados (2-3 órdenes de magnitud) con un incremento muy marcado del número de neutrófilos (Underwood y Suttle, 2002).

IV.11. Cobre en pelo y lana

Las concentraciones de cobre en pelo y lana, tanto en ovejas como en ganado vacuno, tienen un valor relativo como ayuda diagnóstica. Pueden reflejar una ingestión de cobre subóptima, lo que se vería con el deterioro de la capa del animal (Suttle y Angus, 1978; Suttle y McMurray, 1983). A la hora de la interpretación diagnóstica no se debe olvidar que otras deficiencias nutritivas también pueden influir en el crecimiento del pelo y de la lana.

IV.12. Hallazgos de necropsia

En los animales que mueren durante la fase hemolítica se constata la presencia de una ictericia generalizada y líquido seroso en las cavidades; el hígado presenta un aspecto friable y un color anaranjado o amarillento; los riñones muestran un color marrón-oscuro, están edematizados y de consistencia disminuida; la orina es de color café o rojo oscuro (Howell y Gooneratne, 1987; Underwood y Suttle, 2002).

Los exámenes histológicos del hígado muestran la presencia de necrosis en gran número de hepatocitos, especialmente alrededor de la vena central. Los hepatocitos además muestran vacuolización, a veces con pigmento de aspecto granular de color amarillo-claro; las células de Kupffer están repletas de pigmentos de color marrón-acaramelado; se observa además una gran retención de bilis en los canalículos biliares. A nivel renal destaca la presencia de un gran número de cilindros granulares rojos o hialinos, vacuolización de las células epiteliales, a veces con pigmentos amarillo-claro en las mismas, dilatación de los túbulos y necrosis de las células de los túbulos contorneados proximales (Maiorka et al., 1998).

V. Factores de variación en la acumulación orgánica de cobre

Como hemos comentado anteriormente, la acumulación orgánica de cualquier metal, tanto tóxicos como esenciales, va a verse condicionada por diferentes factores y hay que tener en cuenta que es difícil poder establecer una relación directa entre los niveles de exposición y las concentraciones tisulares encontradas. Esto es debido a que existen numerosos factores de variación que influyen sobre la absorción y deposición de estos elementos en el organismo (Ma, 1996; Gochfeld, 1997). Estos factores pueden ser propios del animal, así puede haber variaciones en la acumulación dependiendo de la especie animal, raza, sexo, edad; o bien depender de otros factores como puede ser factores dietéticos, interacciones con otros elementos, factores orgánicos, etc. (Goyer, 1995).

De entre las causas propias del animal es importante distinguir factores genéticos heredables de factores ambientales. Estos factores que modifican la susceptibilidad podrían actuar en el lugar de exposición (aumentando o disminuyendo la ingesta), podrían afectar a la toxicodinámica del metal (con frecuencia formándose complejos o uniones covalentes) o podrían modificar el transporte al órgano diana o la inmunología, bioquímica o citología del órgano diana (Underwood y Suttle, 2002).

V.1. Influencia de la especie sobre la acumulación orgánica de cobre

La susceptibilidad al padecimiento de desordenes en el metabolismo mineral, tanto en casos de deficiencia como de toxicidad, puede verse condicionada por numerosos factores, dependientes no solo de la dieta, sino también del propio animal. Se considera que existen especies de animales con una marcada diferencia en su tolerancia al cobre dietético.

Hay especie altamente tolerantes al cobre como los caballos y los cerdos, y por el contrario los rumiantes son altamente susceptibles, ya que acumulan grandes cantidades de cobre a nivel hepático. Dentro de los caballos, los ponies son extremadamente resistentes a la intoxicación y pueden tolerar concentraciones tan altas como 791 mg/kg en materia seca sin sufrir ningún tipo de alteración (Smith et al., 1975). El cerdo también se caracteriza por su resistencia, y como ya se ha comentado el cobre se emplea en esta especie en elevadas concentraciones (incluso de 250 mg/kg materia seca) como promotor del crecimiento sin causar ningún tipo de alteración al animal. En el extremo opuesto se sitúa el ganado ovino, especie altamente susceptible al padecimiento de intoxicación crónica por cobre, debido a que presenta una escasa capacidad de eliminar el exceso de cobre en la dieta vía biliar, como consecuencia de su baja capacidad para inducir la síntesis de

metalotioneínas. Aunque de forma tradicional el ganado vacuno se ha considerado relativamente tolerante a la intoxicación por cobre, en los últimos años han aumentado de forma alarmante los casos de intoxicación, debido sobre todo al uso excesivo de suplementos en la ración.

A su vez, existen importantes diferencias interespecíficas en cuanto a su susceptibilidad a padecer desordenes en el metabolismo del cobre, que trataremos en el siguiente apartado.

V.2. Influencia de la raza sobre la acumulación orgánica de cobre

V.2.1. Ganado ovino

La influencia de la raza sobre la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002), llevando a clasificar a los animales como tolerantes y/o resistentes, e incluso, hacer una selección racial específica que se adapte a las necesidades de cada región geográfica en concreto, permitiendo en muchos casos disminuir la incidencia de patologías asociadas tanto a la deficiencia de cobre (como la ataxia enzoótica o los problemas reproductivos), como al exceso o acumulación hepática de cobre.

Entre las diferentes razas de ovejas existen variaciones muy destacables a nivel hepático cuando reciben excesos de este elemento (Woollians et al., 1982; van der Berg et al., 1983). Es el caso de la raza Texel que es de las más vulnerables a la toxicidad por cobre por su mayor retención (Littledike y Young, 1993; Suttle et al., 2002); por el contrario aquellas caracterizadas por una pobre retención desarrollan hipocuprosis cuando el aporte de cobre es insuficiente, pudiendo citar así a la raza escocesa Blackface (Woollians et al., 1986). Estas diferencias genéticas en el metabolismo de cobre en ganado ovino parecen estar asociadas en gran parte a diferencias en la absorción intestinal del cobre dietético (Wiener et al., 1978; Woollians et al., 1983), aunque también pueden producirse por diferencias debidas al metabolismo y distribución del cobre absorbido (Woollians et al., 1982, 1983). La existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas de cobre ha quedado demostrada con éxito en la selección de líneas genéticas con niveles de cobre altos y bajos (dentro, incluso, de una misma raza), donde la herencia genética puede explicar un 0,3% de la variación normal de este parámetro (Radostits et al., 2002).

Así, Wooliams et al. (1982) demostró que el cruce entre ovejas Blackface y Texel Scottish retenían más del doble de cobre en hígado que los animales de raza pura Scottish Blackface (13,7% vs. 5,6% del cobre ingerido). Esto parece deberse a

diferencias en la eficacia de absorción por parte de ciertas razas en relación al cobre consumido.

Wiener et al. (1978) reportaron que las ovejas Orkney, una raza que es altamente susceptible a la intoxicación por cobre, parecían absorber el cobre de la dieta más eficientemente que otras razas. La raza Blackface, una raza ovina que es resistente a la intoxicación por cobre, tenía una temprana saturación de la absorción de cobre comparada con la raza Welsh, una raza susceptible a dicha intoxicación. En otras palabras, el rango máximo de absorción de cobre de la raza Blackface fue bajo con respecto a la Welsh. Varias investigaciones sugirieron que la diferencia en la excreción endógena de cobre también contribuyó a las diferencias genéticas en la retención de cobre hepático.

En un experimento realizado por Suttle et al. (2002) en el cual se utilizaron corderos de razas Suffolk, Texel y Charolais alimentados con una dieta que contenía una mezcla de minerales (entre ellos cobre) y sin adición de ningún antagonista de cobre, se observó lo siguiente:

- El patrón de excreción de cobre de la raza Suffolk comenzó con valores bajos alcanzando una meseta a las 22 semanas de edad; para la raza Texel, en cambio, sus valores se incrementaron continuamente partiendo de un nivel inicial alto con un promedio de 53,7 mmol/kg materia seca de cobre al día.
- La acumulación hepática de cobre varió significativamente con la raza, y la herencia genética puede explicar un 0,85% de la variación normal en la raza Suffolk.
- La alta concentración de cobre en hígado en los corderos de raza Texel respecto a los corderos Suffolk confirma resultados previos obtenidos mediante cruzamientos de estas razas (Woolliams et al., 1982). En el pasado, se creía (Weiner et ál., 1978) o asumía (Woolliams et al., 1982 y 1985) que las variaciones raciales para el estatus de cobre eran debidas principalmente a la diferencia en la proporción de cobre consumido que era absorbido. No obstante, los diferentes patrones de excreción de cobre del hígado para los corderos Texel y Suffolk observados en este estudio parecen explicar mejor las diferencias en la acumulación hepática del cobre. Con respecto a la raza Charolais, no se pudo evaluar la excreción hepática de cobre por la limitación del número de animales en el estudio.

Woolliams et al. (1982) compararon la raza Texel con otras cinco razas, entre ellas la Suffolk) cruzadas con Scottish Blackface, alimentadas con una dieta con 12 o 20 mg Cu/kg materia seca. La actividad de la enzima ASAT (aspartato-aminotransferasa) indicó que el daño hepático fue mayor en el cruce con Texel que en el cruce con Suffolk, debido a la mayor acumulación de cobre en hígado. Además, se observó que

la acumulación de cobre en hígado provoca una disminución del peso y tamaño de la viscera (Wolliams et al., 1982).

En otro estudio realizado por Simpson et al. (2004) se encontró que la raza North Ronaldsay es muy sensible al cobre ambiental sufriendo daños hepatocelulares con exuberante fibrosis e incipiente cirrosis. La raza Cambridge, por el contrario, demostró ser mucho más tolerante y acumular cobre más lentamente, sufriendo un cambio patológico en el hígado, pero sin demasiada fibrogénesis. Esta diferente respuesta patológica podría derivar de una diferente expresión de los componentes celulares constituyentes del hígado.

V.2.2. Ganado vacuno

A diferencia del ganado ovino, en ganado vacuno la información de la que se dispone es escasa y se refiere a un número muy limitado de razas. Así por ejemplo, se ha indicado que ciertas razas como la Simmental y la Charolesa podrían tener mayores requerimientos de cobre que otras como la Aberdeen Angus (Radostits et al., 2000; Underwood y Suttle, 2002). Smart y Christensen (1984) encontraron que las novillas Simmental tenían concentraciones de cobre plasmático más bajas que las razas Hereford y Aberdeen Angus. De forma similar Ward et al. (1995) observaron que en ausencia de suplementación con cobre, los animales de raza Aberdeen Angus tienen mayores concentraciones de cobre plasmático que el ganado Simmental o Charolais. Mullis et al. (2003) en vacuno adulto suplementado con cobre y zinc, observó que los animales de raza Simmental mostraban un menor estatus de cobre que los de raza Aberdeen Angus, lo que sugiere unos mayores requerimientos de este mineral.

A la hora de explicar las diferencias raciales en el metabolismo de cobre en ganado vacuno, y por tanto en las necesidades de cobre en dichos animales, se ha propuesto que pueden deberse, al igual que el ganado ovino, tanto a diferencias en la absorción de cobre a nivel intestinal, como en la excreción biliar del mismo. Así, en un estudio realizado por Gooneratne et al. (1994) empleando distintos tipos de dietas (con niveles altos y bajos de cobre, con o sin suplementos de molibdeno y azufre) se puso de manifiesto que la excreción biliar de cobre en la raza Simmental fue al menos dos veces la de la Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta, lo que hace que esta raza esté especialmente predispuesta a sufrir procesos de deficiencia de este oligoelemento.

Las diferencias observadas en los depósitos corporales de cobre entre razas también podrían estar asociadas a diferencias en la cantidad de alimento ingerido, siendo ésta muy variable y atendiendo a las necesidades fisiológicas de los animales. Du et al. (1996) observaron como al recibir la misma ración *ad libitum* rica en cobre, el ganado Jersey acumuló cobre en hígado un poco más rápido que el Holstein, aunque también es cierto que consumían más alimento por unidad de peso metabólico. Se

encontraron además diferencias en la actividad de la ceruloplasmina, lactato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa. Este estudio fue la primera demostración de las diferencias genéticas en la concentración del cobre hepático dentro del vacuno de leche. Incluso aunque las vacas Jersey parecen ser más susceptibles a la intoxicación por cobre y tenían mayor cantidad de cobre plasmático que las Holstein (Gibson et al., 1987), las diferencias genéticas fueron asociadas a la deficiencia en la absorción de cobre dietético, excreción de cobre endógeno y la cantidad de comida ingerida.

Morales et al. (2000), en otro estudio realizado con las mismas razas, encontraron un consumo de alimento más alto al inicio del estudio para las vacas de raza Holstein, si bien se igualaba al expresarlo como porcentaje del peso corporal. La concentración de cobre plasmático se vio incrementada por el consumo de dietas bajas en cobre, y su efecto fue mayor en vacas Holstein, causando una interacción de cobre x raza. Contrariamente, la concentración de cobre en leche fue más alta en la raza Jersey, y las dietas bajas en cobre disminuyeron esta concentración principalmente en Jersey con respecto a las Holstein. La depleción de cobre disminuyó el cobre en leche y esto llevó a los autores a pensar que la concentración de cobre en leche puede ser un indicador más agudo del estatus de cobre de los animales que el cobre en plasma.

Otras posibles explicaciones a la variación racial de los depósitos de cobre podrían situarse en las diferencias en el tamaño relativo del hígado y los estatus normales de otros oligoelementos, así por ejemplo, Littledike et al. (1995) han constatado que la raza Limousin acumula más cobre a nivel hepático tras largos periodos de suplementación, lo que podría explicarse teniendo en cuenta el tamaño pequeño del hígado así como unos mayores niveles de zinc hepático en comparación con otras razas de vacuno. En otro experimento, estos mismos autores evaluaron nuevamente la raza Limousin pero comparándola, en este caso, con la raza Piamontesa y Hereford, para observar el efecto de la raza sobre la concentración mineral en tejidos en ganado de carne. Nuevamente hallaron que la raza Limousin acumula más cobre en hígado que las otras razas (Piamontesa y Hereford). Los datos podrían implicar una mayor necesidad de minerales o una mayor eficiencia en el uso de los minerales de la dieta por parte de la raza Limousin. Estas investigaciones concluyeron que el ganado Limousin podía adaptarse mejor a un medioambiente donde el contenido de cobre sea limitante, como vimos anteriormente. Finalmente los niveles de cobre en plasma fueron influenciados por la raza, las novillas Hereford tuvieron concentraciones de cobre plasmático más bajas que la raza Piamontesa.

En un estudio llevado a cabo en animales alimentados sobre pastos abonados reiteradamente con purines de cerdo ricos en cobre se observó que la acumulación hepática de cobre en terneros de raza Frisona ($92,7 \pm 3,92$ mg/kg) fue casi un 50% superiores a la raza Rubia Gallega ($62,3 \pm 2,99$ mg/kg) y un 20% a la de los cruces

industriales de ambas razas ($76,3 \pm 2,88$ mg/kg). Además, la raza Frisona presentó el mayor porcentaje de casos (42%) con niveles hepáticos de cobre por encima de los rangos de normalidad (>100 mg/kg peso fresco; Puls, 1994), frente al 27% en los cruces industriales y al 13% en los terneros de raza Rubia Gallega. A nivel sanguíneo, los niveles de cobre mostraron el mismo patrón de distribución por razas, siendo en este caso las concentraciones sanguíneas de cobre en terneros de raza Frisona ($0,906 \pm 0,17$ mg/l) un 18 y un 6% superiores a los de las razas Rubia Gallega ($0,766 \pm 0,13$ mg/l) y los cruces industriales de ambas ($0,853 \pm 0,12$ mg/l) respectivamente (Cruz, 2005, Miranda et al., 2006). No obstante, en este estudio a diferencia de los experimentos mencionados anteriormente, los animales no han estado sujetos a condiciones experimentales que permitiesen evaluar si las diferencias observadas se deben a un distinto nivel de absorción intestinal o excreción biliar o a diferencias en la cantidad de exposición a cobre en la dieta.

En ganado vacuno son necesarios nuevos estudios metabólicos en condiciones experimentales que nos permitan establecer si las diferencias observadas entre el nivel de acumulación hepática de cobre en las distintas razas obedece a diferencias metabólicas (a nivel de la absorción intestinal, acumulación hepática o excreción biliar) o se debe a diferencias de grado de ingestión del alimento. Los resultados de estos estudios podrían tener una gran importancia de cara a la selección de animales más resistentes ante procesos de deficiencia como de intoxicación por cobre, tal y como se ha hecho en ganado ovino para adaptarlos a zonas donde existe un problema de deficiencia o excesos de exposición al mismo (Cruz, 2005). Conocer las necesidades de cobre en las distintas razas permitiría además adaptar las necesidades de este oligoelemento en las dietas y minimizar los riesgos de intoxicación crónica por cobre en ganado vacuno suplementado de forma rutinaria con niveles relativamente altos de cobre (Livesey, 2002).

Existen otras investigaciones como las realizadas por Engle y Spears (2001) que intentaron determinar los efectos del cobre dietético sobre el rendimiento y el metabolismo lipídico en terneros Simmental. En dicho estudio, la suplementación de cobre a terneros Simmental tuvo mínimos efectos sobre el metabolismo de los lípidos. Esto contrasta con los efectos del cobre sobre el metabolismo lipídico observado en ganado de raza Aberdeen Angus y sus cruces con Hereford (Ward and Spears, 1994; Engle and Spears, 2000a, Engle et al., 2000a, b). Esta diferencia entre razas relacionada con los efectos del cobre sobre el metabolismo lipídico podría deberse a diferencias en el metabolismo de cobre entre las razas Simmental y Aberdeen Angus (Gooneratne et al., 1994; Wards et al., 1995), o bien a diferencias en el metabolismo lipídico entre razas. De hecho, estudios previos en las razas Aberdeen Angus y sus cruces con Hereford indican que la suplementación con cobre

reduce el espesor de grasa dorsal sin alterar el marmolado de las carnes o incrementar los ácidos grasos poliinsaturados en músculo.

V.3. Influencia del sexo sobre la acumulación orgánica de cobre

Diversos autores han estudiado la influencia del sexo sobre los niveles orgánicos de cobre en rumiantes, aunque los resultados obtenidos no son concluyentes. En ganado vacuno adulto Kottferová y Koreneková (1997) encontraron diferencias significativas entre los niveles de cobre en hígado y riñón, siendo éstos significativamente superiores en las hembras, aunque no se encontraron diferencias en tejido muscular. De forma similar Khan et al. (1995) describen mayores niveles de cobre en hembras de ganado caprino a nivel hepático, sin encontrar diferencias a nivel renal y muscular. López-Alonso et al. (2000a) describe únicamente diferencias estadísticamente significativas entre sexos en la sangre, donde las hembras presentan niveles superiores a los machos. Por el contrario, Miranda et al. (2000) en un estudio llevado a cabo en Asturias (España) encontró que los niveles de cobre en hígado eran superiores en los machos, mientras que en el riñón lo era en las hembras; en el músculo y la sangre las diferencias no eran estadísticamente significativas. De forma similar, Cruz (2005) describe mayor acumulo de cobre en hígado en terneros machos (14%) que en hembras (machos: $77,6 \pm 2,45$, hembras: $68,0 \pm 3,22$ mg/kg peso fresco). Hyvarinen y Nygren (1993) describen niveles mayores de cobre en ciervos macho, hecho que atribuyen al traspaso de cobre de las hembras a los fetos.

Estas diferencias entre estudios indican posiblemente que junto con el sexo pueden existir otros factores que hacen variar los niveles de cobre, como puede ser el nivel de exposición (muy alto en nuestro estudio) o la edad de los animales (jóvenes o adultos).

Estudios llevados a cabo tanto en animales de laboratorio como en la especie humana ponen de manifiesto una influencia hormonal ligada a los niveles de estrógenos en el metabolismo de cobre (Piscator, 1979; Terrés-Martos et al., 1997). Así, está bien establecido que las hembras presentan concentraciones superiores de cobre en suero o sangre que los machos debido a una mejor eficacia en la absorción de cobre a nivel intestinal, eficacia que aumenta con la gestación, y también a que las hembras presentan unos niveles de ceruloplasmina (principal transportador de cobre hepático hacia los tejidos) superiores a los machos (Russanov et al., 1981).

V.4. Influencia de la edad sobre la acumulación orgánica de cobre

El cobre es un oligoelemento esencial en el desarrollo fetal, lo que hace que la evolución del metabolismo del cobre en rumiantes deficientes de este mineral haya sido muy bien estudiada durante la preñez, tanto en la madre como en el feto. Así, se ha demostrado que ocurren cambios importantes en el metabolismo de cobre en la hembra durante la preñez, encaminados fundamentalmente a aumentar la eficacia de absorción intestinal y disminuir la tasa de excreción biliar, con el objetivo de asegurar el aporte fetal (Gooneratne et al., 1989a). En el feto, que es extraordinariamente eficaz en captar cobre de la madre, el cobre se acumula de forma exponencial, lo que hace que el incremento diario en las reservas hepáticas así como la concentración final de cobre al nacimiento sean muy superiores a las de la madre.

Después del nacimiento, los niveles de cobre en el recién nacido disminuyen, en parte debido a que el contenido en la leche es bajo (Evans, 1973) y a partir de que el animal empieza a ingerir alimento los niveles de cobre, especialmente las reservas hepáticas, van a estar condicionadas por las concentraciones de cobre en la dieta.

En la actualidad se dispone de muy poca información del efecto de la edad sobre los niveles de cobre en sangre y la acumulación orgánica en terneros dentro de la orquilla de edad considerada en este estudio. Spierenburg et al. (1988) encuentran un incremento en los niveles de cobre en hígado de ganado vacuno procedente de una zona contaminada, mientras que Khan et al. (1995) no observaron diferencias significativas entre animales jóvenes y adultos en hígado, riñón y músculo en una zona poco contaminada. Como hemos indicado, los rumiantes son capaces de almacenar elevadas concentraciones de cobre a nivel hepático cuando la exposición al metal es elevada se sobrepasa la capacidad de excreción biliar. Esto explicaría por que en estudios con animales expuestos a niveles altos de cobre los niveles de cobre aumenten con la edad.

En terneros, Cruz (2005) y Miranda et al. (2006) describen un aumento de la acumulación renal de cobre con la edad, mientras que en hígado (aunque la tendencia es a aumentar) no observaron diferencias significativas. Sin embargo, en ganado vacuno adulto (López Alonso et al., 2000a) en un estudio en el que se valoraba la influencia de la edad sobre la acumulación de diversos metales se observó que los niveles de cobre disminuían con la edad, lo que podía ser atribuido a un antagonismo por la acumulación de cadmio en dicho órgano. Está bien establecido que existen complejas interacciones entre el cadmio, cobre y zinc a nivel orgánico debido a que estos metales tienen propiedades químicas similares y compiten por los

lugares de unión a las metalotioneínas, fundamentalmente en el riñón donde el cadmio se acumula de forma importante con la edad.

V.5. Influencia de la época del año sobre la acumulación orgánica de cobre

La influencia estacional sobre los niveles de cobre en rumiantes ha sido estudiada especialmente en regiones con deficiencia de cobre. Así, está bien establecido que los episodios de deficiencia primaria de cobre ocurren sobre todo en primavera y verano, coincidiendo con los niveles más bajos de cobre en los pastos (Radostits et al., 2002); en los casos de deficiencias secundarias, sin embargo, la incidencia puede ser mayor en otras épocas del año, dependiendo de la concentración de otros elementos como el molibdeno en el pasto, el cual suele alcanzar concentraciones máximas en otoño cuando la lluvia estimula un fuerte crecimiento de las leguminosas.

Cuando se evalúa la influencia estacional sobre los niveles orgánicos de cobre, como en nuestro estudio, es importante tener en cuenta la información que aporta el parámetro elegido. Así por ejemplo, mientras que los niveles de cobre en sangre o suero nos dan una información reciente de exposición a través de la dieta, las concentraciones en hígado reflejarán los niveles de metal consumidos en los meses precedentes. El parámetro que más se ha utilizado en este sentido es el nivel de cobre en suero, donde se constata que existen importantes variaciones mensuales, tanto en ganado de carne como de leche, que están correlacionadas con la intensidad de las precipitaciones, coincidiendo los niveles más bajos en sangre con la época de lluvias más intensa (Radostits et al., 2002). De forma similar, Smart (1984) ha descrito importantes variaciones estacionales en los niveles de cobre sérico en animales en pastoreo, con concentraciones más bajas entre febrero y marzo y más altas entre agosto y septiembre. Coincidiendo con estos resultados Cruz (2005) y Miranda et al. (2006) observaron que los niveles de cobre en sangre fueron significativamente más bajos en terneros sacrificados en invierno, coincidiendo con la época de más lluvias en Galicia y la alimentación a base de heno seco.

V.6. Interacciones del cobre con otros metales

De entre los numerosos factores de variación que influyen sobre la absorción y deposición de metales en el organismo, la interacción con otros metales tóxicos o esenciales es uno de los más importantes (Goyer, 1995). Estas interacciones pueden clasificarse en dos grandes grupos, las competitivas y las no competitivas.

Las interacciones competitivas se producen entre elementos que tienen la misma estructura electrónica y comparten la tendencia a formar complejos y a que se

dispongan ligandos alrededor del metal; cuando se produce el reemplazo isomorfo de un elemento por otro en un punto funcional se producen los antagonismos. Todas las interacciones competitivas tienen dos cosas en común y es que son *negativas* y *mutuas*. A modo de ejemplo podemos señalar el efecto de la ingesta excesiva de cobre y zinc. Así, en ratas con una dieta que contenía niveles adecuados de cobre se observaron signos indicativos de deficiencia cuando las dietas eran suplementadas con niveles altos de zinc. Por otro lado cerdos alimentados con altas concentraciones de cobre sufrían paraqueratosis que es un signo característico de deficiencia de zinc (Underwood y Suttle, 2002).

En las interacciones no competitivas las fluctuaciones con deficiencia o exceso de uno (o más) elementos influyen en el metabolismo final de un segundo elemento o interfieren en algún proceso biológico esencial que afecta a la expresión final de su actividad biológica. Entre las interacciones no competitivas más importantes en animales debemos señalar el efecto de la deficiencia de cobre sobre el metabolismo del hierro, o el efecto del molibdeno y azufre sobre el estatus de cobre, como se tratarán en detalle en este capítulo. Teniendo en cuenta la influencia de antagonistas como el hierro y molibdeno en la incidencia de desórdenes que afectan al cobre, su prevención debería alcanzarse en la medida de lo posible reduciendo la exposición de dichos antagonistas (Suttle y Underwood, 2002).

V.6.1. Interacciones del cobre con elementos tóxicos

V.6.1.1. Cadmio

Las interacciones entre cadmio, zinc y cobre se han registrado tanto en mamíferos procedentes de áreas contaminadas como en estudios experimentales (Webb, 1979; Nicholson et al., 1984; Spierenburg et al., 1988) y son una consecuencia de la capacidad compartida de estos metales para inducir la síntesis de metalotioneínas y la competencia por los sitios de unión tiol de las mismas (Webb, 1979). Las interacciones entre cadmio, cobre y zinc han sido también descritas con niveles de exposición a cadmio bajos, tanto en humanos (Rahil-Khazen et al., 2002) como en animales (López Alonso et al., 2002), lo que podría sugerir un efecto del cadmio sobre el metabolismo de los elementos traza incluso a niveles de exposición ambiental bajos. Blanco-Penedo et al. (2006) describen una tendencia de correlación negativa entre los niveles de cobre hepático y cadmio renal en animales expuestos a cobre, lo que posiblemente indica una competencia de ambos metales a nivel de su absorción intestinal que hace que los animales expuestos a niveles altos de cobre muestren menores residuos de cadmio.

El cadmio dietético afecta a la absorción intestinal y contenido tisular de hierro, cobre y zinc (Groten et al., 1991), ya que estos metales forman parte de determinados enzimas que desempeñan un importante papel en la prevención de

daños relacionados con la peroxidación lipídica. La gran potencia del cadmio como antagonista del cobre también se demostró en ratas, ovejas preñadas y en sus crías cuando las dietas contenían bajos niveles de cadmio (Mills y Dalgarno, 1972; Campbell et al., 1978). Así, con contenidos de cadmio de 1,5 a 12 mg/kg los niveles de cobre en hígado y plasma sufrieron una gran disminución y en ocasiones se presentaron signos de rarefacción ósea y reducciones en el crecimiento.

Sin embargo, los experimentos con zinc en los que aparecen alteraciones en el metabolismo con bajas ingestiones de cadmio son un reflejo de la composición y en particular del contenido de cobre de la dieta (Campbell et al., 1978). El antagonismo de ambos elementos tiene un beneficio extra que es el descenso de la concentración de cadmio en un 50% en el riñón de ratas; así que ante una exposición prolongada de cadmio, el inicio del daño renal podría retrasarse con suplementación de cobre.

Por último comentar que hay estudios que señalan la posibilidad de una reducción de la transmisión placentaria de cobre en ovejas y vacas ante pequeños aportes de cadmio. La relación antagónica entre el cobre y el cadmio podría tener lugar desde antes del nacimiento. El papel del cobre en el desarrollo del feto puede ser inhibido en ovejas y ratas preñadas al ser suplementadas con cadmio (Mills y Dalgarno, 1972; Choudhury et al., 1978) por lo que puede ser responsable de la baja disponibilidad y el bajo peso al nacimiento que a veces se observó bajo estas circunstancias.

V.6.1.2. Plomo

A pesar de no ser una interacción tan estudiada como la que ocurre por ejemplo entre plomo-calcio o plomo-hierro (Goyer, 1995), en la literatura científica hay varios ejemplos de interacción entre plomo y cobre. Los primeros estudios que evidenciaron la interacción entre ambos metales se realizaron en ratas, en las que se comprobó que tras administrar grandes cantidades de plomo en la dieta los animales presentaban una absorción de cobre deficiente o marginal (Dhawan et al., 1995). En estos animales se observaron bajos ratios de crecimiento, concentraciones séricas y actividad de ceruloplasmina bajas, cardiomiopatía, paraplejia y anemia al administrar de 0,5 al 3 % de plomo como acetato de plomo trihidratado (Klauder et al., 1972; Michaelson y Sauerhoff, 1973; Petering, 1980). También se ha descrito una asociación negativa entre plomo y cobre en hígado en animales expuestos a bajos niveles de plomo (Spierenburg et al., 1988; Miranda, 1999) aunque según Rahil-Khazen et al. (2002) y López Alonso et al. (2002) ambos metales no estaban asociados estadísticamente. Blanco-Penedo et al., (2006) describen una fuerte correlación positiva entre ambos metales en hígado en animales expuestos a cobre, lo que indica que la exposición a niveles elevados de cobre favorece la deposición de plomo en este órgano.

Se ha observado, además, que la deficiencia de cobre aumenta la acumulación de plomo en los tejidos, y que la suplementación de cobre en estos animales produce una rápida disminución del plomo en glóbulos rojos, hígado, riñón, y cerebro; estos hechos sugieren que la interacción entre estos elementos se produce durante la fase de absorción intestinal, si bien el mecanismo de interacción se desconoce. También se ha demostrado en animales de laboratorio que la adición de 1,5 a 20 mg/kg de cobre en la dieta aumentaba la acumulación de plomo en hígado y riñón cuando este último metal era ingerido a dosis de 200 mg/kg (Cerklewski y Forbes, 1977).

V.6.2. Interacción del cobre con otros elementos esenciales

V.6.2.1. Molibdeno

La interacción triple entre cobre-molibdeno-azufre es un ejemplo de interacción no competitiva negativa frecuentemente encontrada en la nutrición de rumiantes (Suttle, 1991; Smith y White, 1997). La formación mediante reacciones químicas de complejos tiomolibdatos (TM) a partir de molibdatos y sulfatos tiene lugar sobre todo a nivel digestivo y van a disminuir la disponibilidad del cobre, comenzando por el cobre procedente del alimento; además interfieren en su absorción y alteran su distribución tisular. Estos complejos son absorbidos en el rumen, pero gran parte tras superar el ambiente ácido que se encuentra en el abomaso son absorbidos como tal al llegar al intestino delgado. En los rumiantes, el medio ambiente ruminal es el encargado de generar un control microbiológico sobre los compuestos azufrados, comprometidos en la fase de interacción cobre-molibdeno-azufre. Este control modifica naturalmente las concentraciones finales de cobre y molibdeno en los distintos tejidos del organismo (Igarza y Auza, 1995).

Los signos clínicos inducidos por un exceso de molibdeno en la dieta - como son un pobre crecimiento, reducida ingestión de alimento, diarrea, anemia, acromotriquia (pérdida de pigmento en pelo y lana) y anormalidades en articulaciones y huesos - recuerdan la deficiencia de cobre y se pueden revertir con el aumento en la ingesta del mismo.

Los tiomolibdatos son los principales responsables de la patogenia de la intoxicación por molibdeno. Su mayor disponibilidad se concentra a nivel intestinal donde los sulfatos, que son los encargados de deprimir la absorción de molibdatos, se encuentran en menor concentración (Igarza y Auza, 1995). Los tiomolibdatos, tras absorberse sin modificación, se unen en el torrente sanguíneo al cobre y a la albúmina resultando ser estables y no sujetos a hidrólisis. Los tiomolibdatos no desplazan al cobre de la albúmina pues presentan un sitio de unión distinto; es más, la afinidad del sitio de unión parece aumentarse por la presencia de cobre y viceversa, dando lugar a la formación de una proteína-TM-cobre particular en la sangre. Esta triple interacción conlleva un bloqueo del cobre plasmático por lo que se

retarda su transferencia al espacio extravascular y a los tejidos en general; la ceruloplasmina también desciende aunque en este caso no depende del cobre unido a la albúmina. Como consecuencia de estos mecanismos se produce una baja utilización del cobre hepático (que es el órgano de mayor importancia como lugar de depósito de este mineral). Al administrar tetratiomolibdatos (TTMs) se observa una fuerte eliminación de cobre y molibdeno vía biliar, ambos están unidos a macromoléculas siendo parte del cobre insoluble en ácido tricloroacético; en relación al cobre plasmático insoluble en ácido tricloroacético éste parece proceder del cobre corporal, posiblemente del hígado (Igarza y Auza, 1995).

La incidencia de efectos sistémicos tales como niveles de cobre elevados en plasma y a nivel renal ha sido a menudo observada en ovejas con altos niveles de molibdeno en la dieta (Underwood y Suttle, 2002), estos aumentos fueron observados aunque los niveles de cobre fueran bajos. Gooneratne et al. (1989b), tras probar con distintos complejos que contenían molibdeno y azufre comprobaron que aumentaban la acumulación de cobre en el riñón.

En conclusión, las distintas interacciones que tienen lugar en el aparato digestivo pueden reducir la disponibilidad del mineral procedente del alimento y las interacciones sistémicas pueden contribuir al desarrollo de estados metabólicos deficitarios de cobre, por depleción de las reservas tisulares (Igarza y Auza, 1995).

Van Ryssen et al. (1987) realizaron una prueba para determinar los efectos del molibdeno y azufre dietético en el estatus de cobre de ovejas con hipocupremia después de la retirada de cobre de la dieta. En primer lugar, a las ovejas se les administraron 75 mg de cobre al día durante un periodo previo para establecer altos niveles de cobre en sus hígados. Después se alimentaron con molibdeno (0-140 mg/día) y azufre (0-4 g/día) sin añadir cobre en la dieta. Las ovejas con 70 mg de molibdeno al día mostraron un 40% de reducción de cobre en comparación con aquellos animales que no tuvieron suplementos de molibdeno, pero si tenían cobre extra en la ración no se observaba la reducción. Se encontraron, además, niveles altos de cobre en riñón y plasma en todos los grupos de animales que eran suplementados con molibdeno. En los tratamientos con cobre adicional los efectos sistémicos eran menos pronunciados que con un tratamiento de 70 mg de molibdeno sin cobre, lo que sugiere que la fuente de cobre medida en estos efectos sistémicos no tiene como origen la dieta. Van Ryssen et al. (1987) constataron con sus observaciones que el molibdeno dietético en presencia de azufre se une al cobre en el tracto digestivo y que enlaces residuales de tiomolibdato podrían ser absorbidos y reaccionar con cobre en el organismo.

En un experimento realizado en vacunos de dos regiones con forraje pobre y rico en molibdeno (1,7 mg/kg y 72,1 mg/kg respectivamente), Hamaguchi (1999) puso de manifiesto que las dietas conocidas como ricas en molibdeno durante más de 125 días

no afectaban a la salud ni al rendimiento animal. Si la alimentación con el forraje rico en molibdeno se mantenía durante un periodo continuado, no conllevaba deficiencia de cobre o efectos adversos. Los niveles de molibdeno en leche, sangre e hígado se elevaron y los de cobre no se vieron afectados; después de separarlos de la fuente de molibdeno, sus niveles volvieron a ser normales.

En otros estudios, como el realizado por El-Gallad et al. (1983), tras inyecciones intravenosas e intraduodenales de tetratiomolibdatos en ovejas, se observó un aumento del cobre a nivel plasmático, acumulándose en la misma fracción cromatográfica que el molibdeno. Al administrar en ratas el mismo compuesto pero en la dieta, se observó una disminución de la absorción de cobre plasmático, la actividad de la ceruloplasmina así como la concentración hepática de cobre; además el cobre y el molibdeno se unieron a las mismas proteínas y formas ácido-insolubles en plasma y riñón (Mills et al., 1976).

V.6.2.2. Zinc

El antagonismo mutuo entre el cobre y el zinc se presentó como el primer ejemplo de interacción competitiva biológica entre metales con propiedades químicas y físicas similares. Si se suplementa con zinc disminuye la intoxicación por cobre, y también se produce la situación contraria, porque al aumentar el cobre puede afectar al metabolismo del zinc (Bremner y Beattie, 1995).

El principal mecanismo de interacción entre el cobre y el zinc se sitúa en la competencia entre ambos metales por los puntos de unión a las metalotioneínas. La síntesis de metalotioneínas podría estar inducida por metales esenciales y cobre pero también por algunos metales tóxicos. Las metalotioneínas funcionan como un almacén intracelular para el zinc y el cobre (Bebe y Panemangalore, 1996).

La anemia falciforme y la enfermedad de Wilson son dos alteraciones en las que se establece una relación entre el cobre y el zinc. Los pacientes con anemia falciforme se caracterizan por presentar hiperzincuria. La deficiencia de zinc parece producir una ligera acumulación de cobre y un aumento de los niveles de ceruloplasmina, al intensificarse la absorción de cobre. Debido a la deficiencia de zinc, se produce el cierre del mecanismo intestinal de las metalotioneínas y aumenta la absorción de zinc. También se produce un aumento en la absorción de cobre y de sus niveles en el organismo sobre todo a nivel hepático, respondiendo con un aumento en la síntesis de ceruloplasmina. El proceso se revierte con la administración de zinc. La deficiencia de cobre trae como consecuencia la inducción intestinal de metalotioneínas por el zinc (Brewer et al., 1985).

En cuanto a la enfermedad de Wilson, se trata de un desorden del cromosoma-13 relacionado con la excreción hepatobiliar de cobre manifestándose como una progresiva intoxicación hepática y neurológica (Goyer, 1995). La penicilamina resulta

ser efectiva pero es necesario valorar otras posibilidades debido a su toxicidad; así, el zinc se presenta como un tratamiento alternativo a la penicilamina. Para comprobar que el único camino para controlar la acumulación de cobre en la enfermedad de Wilson era la penicilamina se retiró a los pacientes brevemente de la penicilamina y se hizo un estudio del estatus de cobre con la terapia de zinc. Debe prolongarse durante 2 o 3 meses debido a que durante la terapia con penicilamina los pacientes presentan deficiencia de zinc. Así que hasta que no tengan la cantidad suficiente con las dosis farmacológicas el zinc no induce la síntesis de metalotioneínas, de ese modo proporciona un bloqueo de la absorción de cobre (Brewer et al., 1985).

V.6.2.3. Hierro

El metabolismo del cobre y del hierro están íntimamente relacionados (Garrick et al., 2003b). Aunque se sabe que la deficiencia de cobre genera deficiencia celular de hierro no se conoce todavía cual es la base molecular de esta interacción. Hart et al. (1928) fueron quienes registraron una de las primeras interacciones entre elementos traza, así descubrieron que el requerimiento de cobre en la hematopoyesis que relaciona el cobre y el hierro puede describirse como una interacción no competitiva. Se han realizado estudios sobre esta interacción positiva que cobran importancia porque la proteína ferroxidasa-I que contiene cobre, cuya actividad está marcadamente disminuida por su deficiencia, es esencial para la movilización de hierro de los almacenes previos a su incorporación a la hemoglobina (Roeser et al., 1970). Askwith et al. (1994) comprobaron en levaduras que el cobre es un grupo prostético de la ferroxidasa involucrada en el transporte de alta afinidad de hierro.

Tanto el cobre como el hierro son nutrientes esenciales para la mayoría de los organismos, y muchas de sus utilidades están basadas en su capacidad para asumir al menos dos oxidaciones en las reacciones de reducción. Tanto el hierro férrico como el cobre cúprico son esencialmente insolubles en soluciones acuosas a pH neutro y precipitarán bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas, así que por su toxicidad potencial y la dificultad de mantenerlos solubles es por lo que se asocian a transportadores y chaperones en casi todas las fases de su metabolismo. Cuando la capacidad de los transportadores/chaperones/sistemas de almacenamiento esté saturada es cuando llegan a ser tóxicos.

En lo que se refiere al hierro, el control de la absorción, transporte y almacén depende de los cambios y unión a transferrina, ferritina y posiblemente lactoferrina. La metalotioneína juega un papel principal en el secuestro de cobre, lo que lleva a cuestionar si esta capacidad de unirse al cobre implica que pueda realizar una función análoga a la de la ferritina (Cherian, 2003).

Cada día se están descubriendo nuevos mecanismos relacionados con el transporte de metales. El transportador divalente de metal (DMT1) aparentemente transporta ambos metales iónicos (Gunshin et al., 1997), por lo que es otro cruce potencial en la homeostasis del cobre y del hierro. Linder et al. (2003) examinaron la interacción entre cobre y hierro en un mismo cultivo celular, encontrando que la disminución celular aumenta la absorción para ambos iones metálicos y que la disminución celular de hierro o cobre también intensifica el transporte epitelial de hierro desde la cámara apical a la basal. Algunos de estos resultados reflejan la conducta del transportador DMT1. La capacidad de DMT1 de transportar otros metales divalentes como manganeso, cadmio, níquel, cobalto, o plomo (Garrick et al., 2003a) podrían explicar que estos metales interaccionen con el hierro y el cobre. De la misma forma Roth et al. (2003) demostraron que el estatus de hierro afectaba a la toxicidad de manganeso probablemente en una vía en la que comparten un transportador como DMT1.

La ceruloplasmina y la hepaestina son oxidasas de cobre que juegan un claro papel en el metabolismo del hierro, ambas están involucradas en la exportación de hierro de algunas células. Patel et al. (2000) consideraron el papel de la ceruloplasmina en lo referente a la interacción del hierro y cobre, e identificaron una isoforma de proteína (GPI) que se detectó particularmente en el cerebro, estos hallazgos ayudaron a corroborar la hipótesis del traspaso parcial de funciones entre la ceruloplasmina y la hepaestina porque no todas las formas de proteína se encuentran en el suero.

Otro mecanismo de interacción entre ambos metales puede proceder de IRE/IRP (elementos sensibles al hierro/proteínas reguladoras de hierro). Este sistema sensible asegura que el ARN de los elementos sensibles al hierro se exprese de manera coordinada con la disponibilidad del hierro. Oshiro et al. (2002) concluyeron que algún otro metal podría afectar a este sistema sensible. Arredondo et al. (2003) mostraron que la respuesta de IRP1 (proteína sensible al hierro) con respecto al cobre era similar a la respuesta del hierro.

A pesar del paralelismo también existen importantes diferencias entre hierro y cobre en cuanto a su homeostasis. Linder et al. (2003) revisaron la excreción del cobre que es una de las fases de mayor importancia en cuanto a su homeostasis, diferente al hierro que se pierde a través de procesos que son relativamente independientes de los niveles de hierro en el organismo, excepto ante mayores contenidos de cobre en células que llevan a una ligerísima mayor excreción. Se ha cuestionado por qué los niveles de DMT1 son altos en riñón, una localización que se relacionaría con el proceso de excreción, se cree que asegura la recuperación del hierro filtrado o guía la homeostasis de otro metal (Garrick et al., 2003a).

En la intoxicación crónica por cobre se han descrito modificaciones importantes de los niveles de hierro, especialmente a nivel renal. Durante la fase pre-hemolítica el cobre acumulado en riñón mantiene su función y éste presenta mínimos daños estructurales (Gooneratne y Howell, 1983). Durante la hemólisis, la asociación de cobre y hierro contenidos en el riñón es bastante elevada y destaca su incapacidad funcional a nivel glomerular y tubular. En cuanto a la patogenia no está claro el mecanismo responsable de los cambios degenerativos y necróticos, la ruptura de los lisosomas que liberan cobre, cobre-metalotioneínas, todos pueden ser citotóxicos y dar lugar a una desorganización de la célula. Los mecanismos son quizás similares a los que afectan al parénquima hepático.

La actividad redox del cobre también se asocia a una neurodegeneración (Opazo et al., 2003). Cuando es uno de los síndromes asociados a enfermedades relacionadas como de Wilson y Menkes (Mercer, 1997; Mercer et al., 2003) y aceruloplasminemia (Miyajima et al., 2003), se constata la hipótesis de que ambos metales, cobre y hierro, son críticos para el desarrollo mental propiamente dicho, así como la toxicidad de uno o los dos conlleva al desarrollo de muchas formas de neurodegeneración.

V.6.2.4. Selenio

El selenio es un elemento que presenta importantes interacciones tanto con elementos tóxicos como cadmio, plata y mercurio, como con otros esenciales como el cobre. Posiblemente la interacción mejor estudiada es la que ocurre con el mercurio; así, actúa frente a su intoxicación probablemente protegiendo del daño celular producido por los radicales libres, aumentando la síntesis de la enzima glutation-peroxidasa (que sería inhibida por el mercurio) y formando complejos inactivos de selenio-mercurio (Goyer, 1995).

Uno de los mecanismos en los que se ve involucrado el selenio en la detoxificación de metales consiste en trasladar elementos tóxicos desde la circulación sistémica y concentrarlos en los lisosomas. El selenio intensifica los procesos de concentración y precipitación de ciertos elementos que tienen lugar dentro de los lisosomas, lo que resulta en muchos casos beneficioso. Berry et al. (1995) estudiaron la interacción del selenio con elementos del grupo 1b del sistema periódico y emplearon pruebas de microanálisis para detectar a los elementos en las organelas intracelulares; tras administrar cobre, plata y sales de oro observaron como se concentraban en los lisosomas de hígado o riñón en presencia de sulfuro.

En el caso concreto del cobre, la incorporación del cobre hepático en las metalotioneínas del citosol y sobre todo en los lisosomas constituye un importante mecanismo para la detoxificación celular, ya que como sabemos el patrón de distribución del cobre hepático refleja la distinta susceptibilidad que sufren las

especies y la toxicidad hepática del cobre se reduce enormemente si éste está unido a metalotioneínas (Bremner, 1987).

El papel del selenio al formar parte de la enzima glutathion-peroxidasa es la catálisis de la reducción de peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos (Counotte y Hartmans, 1989). Como la GSH-Px sanguínea se encuentra en los glóbulos rojos funcionando como parte del sistema antioxidativo, protege la célula de procesos oxidativos (Chowdhury y Chandra, 1987; Bires et al., 1991b). En la intoxicación por cobre el selenio neutraliza el efecto tóxico del cobre ya que produce un daño oxidativo en los glóbulos rojos y causa hemólisis (Soli, 1980; Hidiroglou et al., 1984) y peroxidación de lípidos especialmente en los hepatocitos (Nederbragt et al., 1984). Otros nutrientes, como la vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados, metionina, azufre y cobre, interactúan con el selenio y por tanto van a afectar a sus requerimientos.

Bires et al. (1991a) realizaron un estudio tras una administración parenteral de selenio en ovejas para evaluar la influencia en el desarrollo de una intoxicación de cobre. Los resultados confirmaron que el selenio administrado 3 veces por semana no afectaba significativamente a la evolución de los animales intoxicados por cobre.

Otro mecanismo de interacción entre el selenio y el cobre podría situarse en el tracto digestivo donde el selenio da lugar a complejos al asociarse al cobre, como la forma selenito de cobre que es altamente insoluble. Estos complejos tan sólo se solubilizan ligeramente en ácido (Weast 1978) si se forman dentro del rumen, pero no se solubilizan en el abomaso, por lo que pasaría a ser no disponible.

En relación a la asociación casual descubierta entre la deficiencia de selenio y el desarrollo de cáncer en humanos, ésta permitió establecer que los compuestos de selenio dietéticos tienen un papel protector frente al cáncer. Los experimentos realizados en animales expuestos de forma crónica a selenito de sodio, cadmio, plomo y arsénico inorgánico demostraron que estos últimos contrarrestan el efecto anticarcinogénico de los compuestos de selenio administrados. De manera que si se consiguen aclarar estos mecanismos moleculares se descubrirían potencialmente los mecanismos involucrados en la intoxicación crónica de los metales pesados y metaloides (Gailer, 2002).

V.7. Influencia hormonal en el metabolismo del cobre

Es conocida la influencia hormonal de la secreción de las glándulas endocrinas en una amplia variedad de funciones metabólicas en el organismo de los mamíferos. Una de las primeras evidencias de la influencia hormonal en el metabolismo del cobre fue descrita por Krebs en 1928, quien observó que los niveles de cobre en suero de hembras preñadas eran casi el doble de la que presentaban los individuos control

(Evans, 1973). Desde entonces se ha descubierto la participación de numerosas hormonas en el metabolismo del cobre.

V.7.1. Hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento o somatotropina provoca el crecimiento de los tejidos del cuerpo, además tiene muchos efectos metabólicos generales que incluyen un aumento de la síntesis de proteínas en todas las células del organismo, mejora el empleo de las grasas y conserva los carbohidratos. La hormona del crecimiento también influye en el metabolismo del cobre a través de sus efectos en el metabolismo proteico y, como ya sabemos, la síntesis de proteínas tiene un marcado efecto en la homeostasis cúprica (Evans, 1973).

V.7.2. Hormonas adrenocorticotrópica y adrenales

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) controla la secreción de cortisol. Evans y Wiederanders (1968) observaron que múltiples inyecciones de hormona adrenocorticotrópica disminuían los niveles de ceruloplasmina y cobre en plasma de ratas, tanto en animales neonatos como en adultos. Sin embargo, hay otros estudios que muestran resultados opuestos, en los que se constata que no hay un aumento de cobre plasmático tras la inyección de trementina que tiene entre otros un efecto estimulante.

Ante cualquier tipo de estrés se produce un incremento inmediato y notable de la secreción de hormona adrenocorticotrópica en la hipófisis anterior, a lo que sigue en plazo de minutos un aumento de la secreción de cortisol.

Ante el estrés la mayoría de los mamíferos presentan un aumento de los niveles de cobre y ceruloplasmina en plasma. Así, Evans et al. (1969) demostraron que tanto la concentración plasmática de cobre como la de ceruloplasmina se elevaban de forma significativa en ratas adultas después de permanecer siete minutos nadando. De forma similar, Haralambie y Kreul (1970) detectaron un aumento de cobre y ceruloplasmina en suero después de dos horas de ejercicio físico en humanos. Se ha demostrado una relación inversa entre los niveles plasmáticos de cobre y corticosteroides, lo que indica que las hormonas de la corteza adrenal no determinan un aumento de cobre plasmático durante el ejercicio físico; es más, la inyección de esteroides adrenales en ratas adultas no tuvo efectos en los niveles de cobre plasmáticos (Gregoriadis y Sourkes, 1970; Evans, 1973). De esa manera se reforzó como hipótesis provisional que la adrenalina era la responsable del aumento plasmático de cobre y ceruloplasmina asociado al ejercicio físico intenso (Evans, 1973; Gregoriadis y Sourkes, 1970).

V.7.3. Hormonas sexuales

El efecto de las hormonas sexuales femeninas se estudió al administrar estrógenos y se observaron aumentos de cobre sanguíneos en muchas especies de mamíferos (Evans et al., 1970a; Evans, 1973). Rusanov et al. (1981) demostraron que las hormonas sexuales, especialmente los estrógenos, inducían la síntesis de ceruloplasmina en ovejas, además de producir un aumento de la concentración de cobre en hígado.

La gestación también parece tener un efecto significativo sobre la homeostasis de cobre. Butler (1963) demostró en ovejas que la preñez producía un descenso en los niveles de cobre y ceruloplasmina en sangre entera, mientras que en otras especies mamíferas se ha descrito un aumento de los niveles de cobre y ceruloplasmina en sangre al progresar la preñez (O'Leary y Spellacy, 1968).

Esta influencia hormonal presenta importancia, puesto que puede condicionar la susceptibilidad de los animales a padecer procesos de intoxicación por cobre. A modo de ejemplo señalar que en una intoxicación accidental en ganado vacuno lechero al que se le añadió una cantidad excesiva de cobre a la ración comercial, se encontró que la mayoría de los animales afectados que sucumbieron a la intoxicación por cobre eran hembras que se encontraban al final de la preñez o habían parido pocos días antes de la crisis hemolítica (Perrin et al., 1990). Se documenta así que altos niveles de estrógenos aumentan la absorción de cobre en el intestino y pueden acelerar la síntesis de ceruloplasmina y otras proteínas ligantes de cobre.

En cuanto a las hormonas sexuales masculinas, se ha observado que la administración de testosterona produce un aumento de cobre sanguíneo en humanos (Johnson et al., 1959).

VI. Tratamiento y control, suplementación de cobre

VI.1. Tratamiento y control

Una vez que se ha diagnosticado la intoxicación por cobre el tratamiento irá encaminado, además de tratar de estabilizar al animal en la fase de crisis hemolítica, a retirar la fuente de cobre y a reducir los depósitos corporales (especialmente hepáticos) de este mineral (Howell y Gooneratne, 1987; Auza et al., 1999; Underwood y Suttle, 2002)

La primera medida a tomar es eliminar inmediatamente la fuente de cobre. Como en la mayor parte de los casos la intoxicación ocurre a través de la dieta, ésta debe remplazarse por una que contenga un nivel de cobre y de oligoelementos antagonistas adecuado. No obstante, hay que tener en cuenta que los signos de intoxicación pueden seguir apareciendo en el rebaño o incluso algún animal puede morir después de que se haya eliminado el exceso de cobre; esto puede ser debido a que el cobre continua disponible en el rumen o a que el nivel de almacenamiento hepático es muy elevado.

Además, como la crisis hemolítica se desencadena generalmente en situaciones de estrés, un punto fundamental en el tratamiento es evitar todas aquellas situaciones estresantes como traslados, cambios bruscos de temperaturas (especialmente el frío), periodos de ayuno temporales y determinadas prácticas de manejo como la castración o el esquilado en ovejas que puedan suponer un estrés para los animales del rebaño, incluso para aquellos aparentemente sanos (Underwood y Suttle, 2002)

Los primeros tratamientos que se registraron de la intoxicación de cobre fueron el azul de metileno y el ácido ascórbico con el objetivo de corregir la metahemoglobinemia, así como los daños peroxidativos. El azul de metileno, a una dosis de 5-10 mg/kg de peso inyectados en una solución intravenosa al 4%, reducía la metahemoglobinemia (fenómenos oxidativos en la hemoglobina) pero no prevenía las muertes. El ácido ascórbico también fallaba en lo que se refería a revertir los efectos de la intoxicación por cobre como son los daños por fenómenos de oxidación (Braude y Ryder, 1973).

También se evaluó para el tratamiento de la intoxicación por cobre el uso de agentes quelantes que se unen al metal y previenen el daño tisular. En ovejas, 100 mg de 2,3-dimercapto-1-propanol en aceite administrado por vía intramuscular, y di-sodio-calcio-edetato administrado intravenoso fallaron en el intento de aumentar la excreción urinaria de cobre y por tanto fueron inefectivos. La penicilamina, sin embargo, consiguió aumentar la excreción urinaria en más de 20 veces pero su

elevado precio hace que no sea factible su uso para el tratamiento rutinario en animales de granja. Otros compuestos como el dimetil-tiocarbamato tampoco se han mostrado efectivos en la excreción de los depósitos corporales de cobre (Gooneratne y Christensen, 1997).

Los aumentos en las concentraciones de zinc en la dieta muestran un efecto beneficioso contra la intoxicación de cobre, tanto en ovejas como en cerdos, al disminuir la absorción intestinal de cobre. Sin embargo, el hecho de que las concentraciones dietéticas de zinc necesiten elevarse a valores de entre 220-420 mg/kg para que sean efectivas limita su aplicación práctica (Bremner y Davies, 1976). Pero por otro lado se constató que la suplementación con zinc (Van Ryssen y Barrowman, 1987) y D-penicilamina (Botha et al., 1993; Humann-Ziehank et al., 2001) son ineficaces en la eliminación de cobre en sus formas unidas en el hígado. Un aumento en la proteína del concentrado de la dieta, de 10 a 20% también parece proteger contra la intoxicación de cobre en ovino (McPherson y Hemingway, 1965).

En la actualidad el método más efectivo para movilizar en cobre de los depósitos corporales es el empleo de soluciones orales de tetratiomolibdato de amonio (Gooneratne et al., 1989b). Se trata de un tratamiento muy práctico y específico que se basa en la interacción del cobre con molibdeno y azufre para producir compuestos de cobre unido a molibdatos que pueden ser excretados con facilidad.

Tras la administración intravenosa de tetratiomolibdato de amonio a ovejas intoxicadas por cobre se observó una reducción importante en la concentración de cobre en las fracciones hepáticas, en el número y tamaño de los lisosomas electrodensos presentes en los hepatocitos y en el número de células necróticas en el hígado. El tetratiomolibdato es capaz de movilizar el cobre presente en los lisosomas y el citosol de las células cargadas de cobre. Tras la administración de tetratiomolibdato aumenta la concentración de molibdeno total en los hepatocitos así como en las distintas fracciones, lo que indica que el molibdeno procedente de los tetratiomolibdatos está entrando en las células hepáticas. La movilización hepática de cobre trae como consecuencia un descenso de los niveles del metal en el hígado, un aumento de la concentración de cobre en sangre así como de su excreción urinaria. De forma experimental también se ha demostrado la eficacia de los tetratiomolibdatos en la prevención parcial o total de la hemólisis y otros daños titulares (Howell y Gooneratne, 1987; Auza et al., 1999)

En los estudios experimentales llevados a cabo por Gooneratne y colaboradores (1989b, 1997) en ovinos intoxicados por cobre se demostró que los tetratiomolibdatos producen una rápida movilización del cobre hepático para ser eliminado vía urinaria, aunque también se produce un aumento de su excreción vía biliar y se potencia su secreción endógena en el tracto gastro-intestinal. Los mayores efectos de los tetratiomolibdatos en la excreción biliar ocurrían a las 24 horas siguientes a su

administración cuando los efectos sistémicos eran máximos. También demostraron que los tetratiomolibdatos actúan primero en el almacén de tiempo más corto y de forma limitada en el de tiempo prolongado.

Existen distintos protocolos de tratamiento con tetratiomolibdatos de amonio utilizando dosis únicas o repetidas, tanto por vía oral, intravenosa o subcutánea. Durante la fase aguda de una intoxicación por cobre en ovino la administración de 6 dosis de 15mg/kg por vía endovenosa resultó ser efectiva, observándose una disminución de los depósitos de cobre en hígado a niveles dentro de la normalidad (Sansinanea et al., 1995). También se consiguió un control efectivo de la intoxicación de cobre en ovejas tras la inyección subcutánea de tetratiomolibdato de amonio en 3 dosis de 3-4 mg/kg peso vivo en días alternos; este tratamiento causó una disminución substancial del contenido de cobre y del daño ocasionado además de disminuir el ratio de mortalidad en animales que desarrollaron crisis hemolítica, lo que lleva a concluir que la vía subcutánea es tan efectiva como la intravenosa y más conveniente (Humphries et al., 1988). Durante un episodio de toxicidad por cobre en ganado vacuno de leche asociado al uso excesivo de suplementos minerales, se evaluó el uso de tetratiomolibdato de amonio administrado por vía oral como método preventivo, y potencialmente, reductor de los depósitos corporales de cobre. Todos los animales del rebaño (lactantes y no lactantes) recibieron dosis entre 500 y 1000 mg de tetratiomolibdato de amonio con la dieta durante 18 días. Se observó que tras el tratamiento los niveles de cobre en suero habían disminuido considerablemente y tampoco se habían detectado nuevos episodios de mortalidad o intoxicación clínica.

VI.2. Suplementación de cobre

A la hora de establecer una suplementación de cobre es esencial diferenciar si estamos ante una *deficiencia primaria*, que se presenta cuando existe un aporte insuficiente del elemento en el alimento o en el agua de bebida, o ante una *deficiencia secundaria*, que ocurre cuando el cobre está en cantidades adecuadas pero no tiene una absorción y un metabolismo óptimo en el organismo.

A la hora de proporcionar suficiente cobre al ganado nos encontramos con una gran variedad de métodos, que van desde la aplicación de distintos compuestos de cobre a los suelos, alimentos o agua de bebida, a una gran variedad de formas en el propio animal, tanto por vía oral como parenteral. Para la elección del método de suplementación se procura valorar su eficiencia y el mínimo coste. Así mismo, los suplementos deben administrarse diariamente o en largos intervalos; en este último caso la dosis de cobre puede exceder los requerimientos nutricionales y llegar a ser tóxica.

VI.2.1. Suplementación de cobre en suelos

Se sabe que el uso de fertilizantes puede aumentar el rendimiento de las plantas y elevar el nivel de cobre en hierbas y forrajes, si bien los niveles adecuados para los animales suelen ser más altos (77,5 mg/kg cobre materia seca).

Debe tenerse en cuenta que en función del tipo de suelo y del clima las cantidades precisas de cobre a aplicar van a variar. Las primeras experiencias llevadas a cabo en Australia indican que un suelo abonado con 5-7 kg/ha de sulfato de cobre suele ser suficiente para un periodo de 3 o 4 años, excepto en suelos calcáreos (Underwood y Suttle, 2002), mientras que en suelos arenosos se han obtenido efectos residuales prolongados de 23 años o más. No es conveniente tratar con fertilizantes los suelos ricos en materia orgánica porque el cobre se fija a complejos ácidos no utilizables, como tampoco es aconsejable su utilización en casos de hipocuprosis inducida por molibdeno en pastos ricos en cobre.

Los resultados del abonado no son uniformes entre los distintos experimentos. Mientras que en unos trabajos se vio que la aplicación de una cantidad de 2,75 kg de cobre (como sulfato de cobre pentahidratado) por hectárea determinaba un aumento de la carga ganadera durante más de 4 años (Gartrell, 1981), en otros, la respuesta no es consistente e incluso a niveles más altos de 5 a 7 kg/ha el efecto beneficioso permanecía por encima de los cuatro años. Por tanto, es difícil predecir el beneficio año tras año, de manera que puede ser necesario repetir la operación anualmente con el fin de mantener los niveles de cobre adecuados, si bien el coste de la repetición lo hace poco rentable.

Una alternativa a los fertilizantes inorgánicos es la aplicación de purines ricos en cobre, especialmente de cerdo. Como hemos indicado, en las dietas intensivas de porcino se añaden elevadas concentraciones de cobre (del orden incluso de 250 mg Cu/kg materia seca) como promotor del crecimiento, del cual un 80% se elimina en las heces, haciendo que los purines contengan concentraciones extremadamente altas de este metal. McAllister en 1976 constató que la aplicación repetida de purín en granjas de manejo intensivo podría dañar la tierra. Se realizó un estudio para valorar el efecto de la frecuencia y duración en el tiempo de la aplicación de abono porcino y vacuno en el campo, así como la composición mineral de la hierba y las propiedades físicas y químicas del suelo. Los resultados mostraron cambios significativos del contenido mineral; así, se observaron aumentos de cobre (10 mg/kg) y de zinc (44 mg/kg) por la aplicación de purín de cerdo en la hierba seca al primer corte (Christie y Beattie, 1989). Se producía la acumulación de cobre y zinc extraídos por EDTA en el suelo que aumentaba con las aplicaciones progresivas de purín de cerdo, especialmente en los horizontes más superficiales del suelo. Aunque la acumulación de cobre y zinc presumiblemente no era suficiente para producir síntomas de toxicidad en la hierba, las concentraciones podrían afectar a la biomasa

microbiana del suelo. Las dietas que contienen CuSO_4 y purín producen consecuencias análogas indicando que el cobre del purín es relativamente aprovechable y potencialmente tóxico cuando es ingerido un pasto contaminado. No obstante, cabe destacar que el principal riesgo en la aplicación de purines con elevado cobre subyace en la ingestión de pasto contaminado por cobre. Batey et al. (1972) sugirieron que existía un riesgo si se permitía pastar la hierba que estaba físicamente contaminada por purín rico en cobre.

VI.2.2. Suplementación de cobre en la dieta

VI.2.2.1. Concentrados

La aplicación de cobre en los concentrados es uno de los métodos más comunes de suplementación de cobre en todas las especies de granja. Normalmente se añade en forma de carbonato o sulfato de cobre al 5% formando parte de una premezcla junto con otros minerales (como por ejemplo sodio, hierro, zinc y manganeso) que se incorpora en la parte concentrada de la ración. Alternativamente, el sulfato de cobre podría añadirse directamente o rociar el concentrado.

En ganado vacuno la concentración final de cobre se ajusta normalmente a una media de ingesta de al menos 10 mg/kg de cobre de la ingesta total de alimento (concentrado y forraje). El concentrado debe contener mayor cantidad de cobre para compensar el contenido en los forrajes que es mucho menor que 10 mg/kg. De este modo, para el vacuno lechero, el sulfato de cobre podría ser mezclado directamente con el concentrado para darle una concentración final con un rango entre 20-25 mg/kg de cobre. Sin embargo, si se consideran los efectos antagonistas, donde el exceso de molibdeno provoca una deficiencia secundaria de cobre, deberían ser administrados más de 150 mg de sulfato de cobre diariamente o lo que es lo mismo, suplementados con 45 mg/kg de cobre.

La ventaja de incorporar el cobre en la porción de concentrado de la ración es que con este método se garantiza que cada uno de los animales se suplemente diariamente con la cantidad recomendada, pero por otro lado tiene como inconveniente su coste que debería ser considerado. Si la ración contiene muchos componentes, además del proceso de mezclado, (como suele ocurrir en la preparación de la ración de vacas lecheras) el coste es insignificante; contrariamente, cuando la ración prácticamente es de un solo componente (como ocurre en los sistemas de producción de carne con cebada o maíz) los costes de la mezcla no están justificados. Además, este método cuenta con la limitación de que se aplica a sistemas en los que el vacuno está recibiendo una ración con concentrado.

VI.2.2.2. Bloques y mezclas minerales

Cuando los animales no reciben concentrados, una alternativa es considerar el libre acceso a una mezcla de minerales. Así por ejemplo, se previene la deficiencia de cobre proporcionándole piedras para lamer que contengan entre 0,5-1,9% de este mineral, subsanándose la necesidad de aplicación de fertilizantes que en explotaciones extensivas resulta sin duda antieconómica. Un animal que come 110 g de la mezcla que contiene 0,2% de sulfato de cobre hidratado ingeriría aproximadamente 50 mg de cobre.

Si bien es un método económico presenta múltiples inconvenientes: la cantidad de cobre ingerida no es controlada y es imposible asegurar su eficacia en todos los animales del grupo, la ingesta en animales en pasto es irregular y es también difícil mantener la disponibilidad de los minerales y protegerlos de forma adecuada de fenómenos atmosféricos como la lluvia y otras adversidades.

Dunlop et al. (1939) usaron sales para lamer en ovejas con 0.3% de cobre y observaron como la incidencia de ataxia neonatal estaba enormemente reducida pero no eliminada, presumiblemente por el bajo consumo. También hay peligro de intoxicación por cobre cuando se llevan mucha cantidad a la boca cuando lamen.

VI.2.2.3. Suplementación discontinua con sales de cobre

La administración de sales de cobre de forma discontinua se ha mostrado como un método eficaz para la suplementación de cobre en rumiantes, ya que los animales tienen capacidad de almacenar cobre en el hígado durante periodos en los que se ingiere en exceso y movilizarlo de los depósitos cuando los consumos son insuficientes. Las soluciones con sulfato de cobre cada mes o incluso a intervalos más largos suele tener efectos satisfactorios. Sin embargo, cuando los contenidos en molibdeno en el forraje son suficientemente elevados como para inducir diarreas (5 mg Mo/Kg materia seca) puede ser necesaria la suplementación diaria de cobre.

La deficiencia secundaria de cobre inducida por el molibdeno causa una importante reducción en la producción lechera que se puede corregir con dosis de entre 300 y 1200 mg de cobre al día, ante este tratamiento los animales responden con un aumento en la producción de al menos un 10%, lo que justifica su uso durante los 250 días de la lactación (Underwood y Suttle, 2002).

Cuando la deficiencia es menos severa o primaria, la suplementación oral discontinua resulta ser útil, tanto en vacas como en ovejas. Así, Jamieson y Allcroft (1950) en el Reino Unido, probaron una sola dosis de 500 mg de sulfato de cobre en vacuno y observaron como aumentó su desarrollo de forma significativa, sin embargo era necesario aumentar la dosis a 5 g mensuales para mantener unas concentraciones de cobre en sangre dentro del rango de normalidad. McPherson et al. (1983a) observaron que con una suplementación de 1,5 g de cobre en 3 intervalos mensuales

aumentaba el desarrollo del vacuno sin alterar sus concentraciones en sangre. Estos mismos autores con un programa de administración de dosis similar durante los 3 últimos meses de preñez en primerizas constataron que aunque no aumentaban los niveles de cobre en sangre en las hembras sí lo hacían los valores de cobre en sangre en los terneros, demostrando como el cobre había sido transferido a través de la placenta. Los terneros lactantes, sin embargo no recibieron beneficio del cobre que se le daba a la novilla, lo que sugería que no se producía un aumento de cobre en la leche.

La incidencia de ataxia neonatal se redujo del 23 al 3% en ovejas con dosis orales de 125 mg de cobre en intervalos de 15 días durante la preñez (Askari et al. 1979). De forma alternativa estos mismos autores emplearon un programa de dos dosis orales de 220 mg de cobre (1 g de sulfato de cobre) aplicadas 8 y 4 semanas antes de la fecha esperada para el parto. La primera dosis, alrededor de 80 días después de la concepción, aseguró niveles de cobre para la síntesis de mielina que comienza de forma muy intensa el día 100 posconcepción (Askari et al. 1982). En cuanto a la incidencia de la ataxia postnatal en ovejas observaron una reducción importante con esa misma dosis oral de sulfato de cobre durante las primeras semanas de vida.

Además del sulfato de cobre, se ha probado la suplementación oral con otros compuestos como el glicinato y calcio cúprico, también administrados por vía oral, y se ha observado que la retención de cobre en el hígado de ambos compuestos no es mejor que la administración oral de sulfato de cobre que contaría con una retención aproximada del 1.8%, con lo que se concluye que no suponen una ventaja sobre el sulfato de cobre que además es más barato. En cuanto a la suplementación con cobre-lisina en terneros en crecimiento (Kegley y Spears, 1994), se ha observado que el estatus de cobre en estos animales no difiere de los suplementados con sulfato de cobre; ambos presentan la misma disponibilidad, al contrario que el óxido de cobre donde la disponibilidad es muy baja.

A pesar de que las sales de cobre administradas oralmente permiten controlar un gran número de deficiencias de cobre, como hemos comentado, presentan el inconveniente de que solo son efectivas durante periodos cortos de tiempo. Debido a ello, ha habido muchos intentos para desarrollar formulaciones de cobre para dosis orales que permanezcan efectivas durante periodos más prolongados de tiempo. Estas formulaciones incluyen agujas de óxido de cobre y liberación controlada en cristales como veremos más adelante.

VI.2.3. Suplementación de cobre en el agua de bebida

Farmer y colaboradores (1982, 1983) desarrollaron en ganado vacuno en crecimiento dos formas de añadir una cantidad de sales de cobre al agua de bebida de forma controlada. La primera es un mecanismo contador que fija la proporción de algún

elemento traza en el agua de bebida, mientras que la segunda es un sistema de liberación lenta en forma de pellets, a través del cual pasa el agua, haciendo que se disuelva y se mantenga una cantidad fija de ese elemento en el agua.

Utilizando el mecanismo contador observaron que aprovisionaba con 2 o 3 mg/kg de cobre en el agua de bebida a animales que pastaban en una zona rica en molibdeno. Con este método se consiguió una ingesta de cobre de 30 mg diarios, la cual era suficiente para prevenir los signos de una deficiencia secundaria y mantener en la normalidad la concentración de cobre en sangre. Concluyeron estos autores que se trata de un sistema barato, seguro y conveniente para la prevención y el tratamiento de la deficiencia primaria de cobre y la inducida por molibdeno.

El sistema de liberación lenta de cobre era menos efectivo. Al chequear el agua se encontraron valores de 0,08 a 0,16 mg/kg de cobre, lo que indica que en la disolución de los *pellets* se libera toda la forma soluble del metal, quedando mucha cantidad de cobre acumulado en el fango donde estaba contenido el agua.

VI.2.4. Suplementación parenteral

El desarrollo de métodos de suplementación parenteral surge ante la necesidad de minimizar las limitaciones que presenta la suplementación oral, entre ellas, la baja tasa de absorción intestinal y almacenamiento hepático. Así, con la suplementación parenteral se consigue que más de un 75% de una dosis única pueda alcanzar el hígado para su almacenamiento, en comparación con menos de un 10% en las dosis orales. Además, la reducción de las dosis de cobre administradas tiene una gran importancia desde el punto de vista de la calidad medioambiental, puesto que la cantidad de metal que no se absorbe vía oral permanece como residuo en el medio natural.

Jamieson y Allcroft (1950) observaron en terneros como con una dosis de 50 mg de sulfato de cobre por vía intravenosa se conseguían los mismos efectos que con una dosis de 500 mg por vía oral.

Bohman et al. (1984, 1987) valoraron la composición de los tejidos tras la inyección de dos compuestos de cobre, edetato y glicinato. El edetato de cobre causó menos irritación tisular en el punto de inyección que el equivalente de cobre en forma de glicinato. Observaron que el cobre (sobre todo edetato) se moviliza rápidamente del punto de inyección subcutáneo, y aunque las concentraciones plasmáticas aumentan de forma transitoria, el cobre se almacena rápidamente en el hígado tras la inyección, lo que probablemente sirva para minimizar los riesgos de toxicidad del producto debido a las concentraciones que el cobre podría alcanzar en sangre.

Es importante destacar que con este tipo de suplementación no deben realizarse administraciones de cobre adicionales, especialmente en ovejas, ya que una cantidad

que exceda, por encima de los requerimientos nutricionales, por la vía parenteral puede ser almacenada en el hígado y llegar a desencadenar una intoxicación.

Hay distintos factores que determinan la duración del efecto, como la ingesta de cobre en la dieta, la cantidad almacenada en el organismo y los continuos requerimientos diarios. Por ejemplo, las terneras preñadas deben recibir suplementos de cobre adecuados antes del día 50, cuando comienza la primera fase de mielinización en el desarrollo fetal. En ganado ovino, si la deficiencia de cobre es severa durante la preñez, los corderos recién nacidos deberán ser suplementados con cobre vía parenteral. En vacuno de carne con rápido crecimiento que se encuentra pastando en áreas con severa deficiencia de cobre Gleed et al. (1983) demostraron que era necesario repetir la dosis parenteral.

VI.2.5. Agujas de óxido de cobre

Las agujas de óxido de cobre son partículas de elevado peso específico en forma de varilla, con una longitud de entre 1-10 mm, compuestas por óxido de cobre y alambres de cobre oxidado que pueden ser administradas fácilmente en gelatina o una cápsula similar. Una vez administradas las cápsulas se disuelven lo que permite que las partículas en ella englobadas se liberen durante un periodo de varias semanas, algunas de ellas en los preestómagos pero sobre todo en el abomaso, donde el óxido de cobre se disuelve de forma lenta a pH ácido (Cameron et al., 1989).

El ritmo óptimo de dosificación es de 0,1 g/kg de peso vivo (Suttle, 1987). Deben controlarse las dosis elevadas en ovinos por la peligrosidad de causar una toxicidad, si éstas ya cuentan con buenos niveles de cobre (Allen et al., 1984). La principal ventaja que presentan frente a otros métodos de suplementación es que las reservas hepáticas de cobre pueden mantenerse durante meses después de una dosis única (McFarlane et al., 1991).

En ovinos, este tipo de suplementación es uno de los mejores métodos para prevenir la deficiencia de cobre y sus implicaciones. Suttle (1981) demostró que 0,5 g de cobre (0,64 g de agujas) protegía de forma efectiva contra la hipocupremia, mientras que Cavanagh y Judson (1994) concluyeron que con dosis de 2,5 g de óxido de cobre se podría prevenir la deficiencia de cobre en breves periodos de tiempo en ovejas en pastoreo sin ningún riesgo de intoxicación por cobre.

Judson et al. (1982) realizaron diversos experimentos en ovejas de la raza merina en Australia a las que se les prescribió dosis de 2 a 16 g de cobre. Concluyeron que con dosis de 2,0 g se incrementó la concentración de cobre en el hígado por lo menos durante 30 semanas.

Whitelaw et al. (1983) administraron 3,2 g de cobre en terneros con deficiencia inducida y 1,6 g a corderos con edades comprendidas entre 3-5 semanas, pero no

consiguieron constatar cual era su efecto valorando las concentraciones de cobre en el hígado.

Deland et al. (1979) administrando dosis de 50 g en terneros de 3 meses observaron que los animales estaban protegidos durante seis meses contra la deficiencia de cobre (hipocupremia, bajas concentraciones de cobre en hígado, reducciones en la producción). Al comparar sus efectos con la aplicación de una dosis única parenteral de 120 mg de cobre en forma de glicinato de cobre constataron que la protección alcanzada era mejor en el primer caso.

McPherson (1983a) encontró que con una dosis de 3,2 g de cobre en terneros y de 8 a 16 g en novillas y vacas de carne adultas en pastoreo, los animales quedaban protegidos frente a las deficiencias estacionales producidas por el pasto. Whitelaw et al. (1983) administraron 16 g de cobre a terneros de 190 kg y observaron como su índice de crecimiento se vio aumentado de forma significativa al igual que los niveles de cobre en sangre durante varios meses. McPherson (1983b) administró 48 g de cobre en vacas de carne con el objetivo de conseguir una protección por largos periodos de tiempo y concluyó que estaba suficientemente justificada la dosis ya que se alargaba el periodo de protección a casi 8 semanas. El vacuno adulto se encuentra suficientemente protegido durante 6 meses con dosis de 16 g de cobre.

En ovinos, el tratamiento temprano durante la preñez protege a sus crías gracias a la transferencia de cobre a través de la placenta (Gooneratne y Christensen, 1985). Tanto en ovino como en vacuno los niveles de cobre que son transferidos a través de la leche son pobres, es probable que los terneros se vean afectados y que se les deba administrar para la deficiencia de cobre dosis de hasta 20 g.

Judson et al. (1984) estudiaron algunos factores que condicionan la disponibilidad del cobre en las agujas. Demostraron que en ovino, tanto en extensivo como en intensivo, el efecto del grado de llenado del rumen en el momento de la administración de la dosis era insignificante. Observaron además que las partículas de cobre eran más efectivas para alcanzar niveles de cobre hepáticos si presentaban un tamaño uniforme (de 3,0 a 4,0 mm de longitud, de 1 a 1,2 mm de diámetro, con un promedio de 140 partículas en 2,5 g) que si había tamaños distintos.

Si se quiere conseguir la máxima eficacia de estas partículas se deben controlar las enfermedades parasitarias y otras causas de diarrea, ya que en estudios realizados en Nueva Zelanda por Bang et al. (1990) se sugirió que cuando los parásitos incrementaban el pH del abomaso la cantidad de cobre liberado de las partículas de óxido de cobre era menor.

VI.2.6. Liberación controlada en cristales

La utilización de cristales ha sido evaluada como un posible método de suplementación de cobre de larga duración por Allen et al. (1984), quienes han descrito como su solubilidad depende sobre todo de las concentraciones de los constituyentes principales (calcio, sodio e iones fosfato) variando así el cristal de insoluble a soluble, si bien en todos los casos las variaciones en la proporción de cobre tienen un mínimo efecto en su solubilidad. De forma adicional estos cristales también pueden contener selenio y cobalto.

Estos mismos autores describieron el uso de cristales con un 18% del peso de cobre que tras el procesado bajo la forma de cápsulas cilíndricas contaban con un peso aproximado de 17 y 75 g para ovejas y vacuno de carne en crecimiento respectivamente; estos cristales se incrustan en la parte anterior del estómago de manera que el cobre se va liberando diariamente desde un mínimo de 2,1 mg en ovino a 11 mg en vacuno; incluso aunque este ratio de liberación se mantuviera tan sólo en un 50% en las ovejas y un 30% en los terneros de la recomendación diaria dietética, la concentración hepática de cobre se elevaría de forma muy importante. En un experimento realizado con ovejas se observó un aumento de la actividad de ceruloplasmina al menos durante un año desde su aplicación (Carlos et al., 1985).

La mayor ventaja es que aprovisiona suplementos adicionales de cobre en una proporción uniforme durante muchos meses. Mientras que las agujas son efectivas 6 meses después de la dosis, esta forma cristalizada lo es más allá, es decir, sólo es necesaria una administración anual.

Como un posible inconveniente, debemos señalar que en su primera comercialización en ovejas se sugirió que la cantidad de cobre que se liberaba no era suficiente para prevenir el desarrollo de ataxia neonatal en corderos de madres tratadas, si bien esta limitación se podría contrarrestar con un aumento en la solubilidad del producto.

VI.2.7. Suplementos de cobre inorgánico vs. orgánico

La baja disponibilidad del cobre en los alimentos para rumiantes ha hecho necesario potenciar el uso de agentes que protejan al cobre contra antagonistas que actúan en el rumen, pero desafortunadamente este objetivo no se ha logrado. Se han propuesto mezclas de hidroxilatos Cu-proteína (“metalosatos”) y de complejos aminoácidos específicos como Cu₂:lisina. En varios estudios en ganado vacuno en los que se han probado metalosatos (Wittenberg et al., 1990) y Cu-aminoácido (Ward et al., 1993; Kegley y Spears, 1994; Du et al., 1996; Yost et al., 2002) y en un estudio en ovino con Cu₂:lisina (Suttle y Bremner, 1996) no se ha demostrado que ninguna de estas fuentes tenga ventajas sobre el tradicional sulfato de cobre. En estudios con cerdos o aves

tampoco mostraron una disponibilidad superior sobre el sulfato de cobre, la metionina-Cu ni la lisina-Cu (Baker y Ammerman, 1995).

VI.2.8. Selección genética

Se pueden aprovechar las variaciones genéticas referidas al metabolismo del cobre para prevenir las deficiencias y disminuir la dependencia de una suplementación en el caso de problemas endémicos. Woollians et al. (1985, 1986) seleccionaron carneros jóvenes por sus concentraciones plasmáticas de cobre a lo largo de cuatro generaciones consiguiendo eliminar la hipocuprosis en un rebaño calificado como “vulnerable” sin la necesidad de recibir una alimentación específica. Otra opción es cruzar corderos de un rebaño calificado como “tolerante” como Texel con corderos escoceses Blackface para así reducir los problemas de hipocuprosis.

VI.2.9. Minimización de los antagonismos

Teniendo en cuenta la influencia de antagonistas como el hierro y especialmente el molibdeno sobre la incidencia de desordenes que responden al cobre, su prevención puede alcanzarse, en parte, reduciendo al máximo la exposición a dichos antagonistas. En cuanto a los problemas de deficiencia, debe evitarse el uso excesivo de cal y mejorar el drenaje del suelo cuando hablamos del molibdeno. En cuanto al hierro, se consigue disminuir a base de evitar el pastoreo excesivo. Además, tanto en rumiantes en pastoreo como adultos en estabulación nunca debe utilizarse hierro para formular suplementos minerales.

I. Animales de estudio y diseño experimental

I.1. Selección de los animales de estudio y condiciones de experimentación

Para llevar a cabo los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral se han empleado 30 terneros de las razas más significativas en terneros de carne en Galicia: raza Rubia gallega (11 animales), raza Frisona (9 animales) y cruces industriales de ambas razas (Rubia gallega x Frisona: 10 animales).

Los animales se adquirieron antes del destete con una edad aproximada de 1 mes. Los datos relativos al animal, así como la comprobación de la línea genética materna (para asegurarnos de que no hubiese interferencias de otras razas) se comprobaron mediante el documento de identificación bovina (DIB) y a través de las bases de datos oficiales de los Servicios Veterinarios de la Xunta de Galicia. La línea paterna se comprobó por los registros de inseminación artificial. No se incluyó en el estudio ningún animal del que no tuviesemos información de la línea genética.

Los animales se mantuvieron en condiciones de experimentación en unas instalaciones diseñadas y preparadas para llevar a cabo el experimento dentro de una explotación ganadera situada en Nadela (Lugo), a 10 kilómetros del laboratorio donde se llevaron a cabo todos los análisis. La estancia de los animales en el cebadero, así como todo el experimento que se detalla a continuación, fue realizado siguiendo las directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales para experimentación (Anexo II al artículo 5 de la Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 de la U.E.; R.D. 223/1998; D. 86/609/CEE; RD 1201/2005).

Los terneros llegaron a la explotación aproximadamente al mes de vida, permaneciendo en ella hasta su traslado al matadero para el sacrificio. Una vez introducidos los animales en la explotación, se procedió al destete y aclimatación de los mismos y se comenzó a realizar un programa sanitario.

En cuanto a las características del alojamiento, los cubículos estaban equipados con dispensadores automáticos de agua y el suelo era de rejillas con caída de las deyecciones al fondo. Los animales estaban separados en tres lotes según cada raza.

En cuanto al programa sanitario, los animales fueron desparasitados con objeto de favorecer tanto su desarrollo productivo como su sistema defensivo. Para ello se

emplearon ivermectina al 1% inyectable (1 mL/50 kg de peso vivo por vía subcutánea, Ivomec®, Laboratorios Merial) y albendazol en suspensión oral (1 ml/10 kg de peso vivo por vía oral, Albensol-10%®, Fort Dodge Veterinaria). Se llevó a cabo también un protocolo vacunal para IBR, PI³, síndrome respiratorio bovino y BVD (a dosis de 2 ml, Cattlemaster-4®, Laboratorios Pfizer); así como vacunación frente a enterotoxemia (4 ml, Toxipra S7®, Laboratorios Hipra).

Como señalábamos anteriormente, una vez incorporados los animales a la explotación se procedió al destete y aclimatación de los mismos. Así, la incorporación de los terneros al consumo de la dieta utilizada en el experimento se realizó de forma paulatina, en primer lugar recibieron un pienso de *arranque o starter*, elaborado a base de lactorreemplazantes y cereales, y posteriormente se introdujo la dieta de crecimiento-cebo.

Se realizó un ciclo de 7 meses, lo que se corresponde con las fases de crecimiento y acabado de los actuales sistemas de cebo de terneros (González y Llena, 1994). Los muestreos se realizaron entre los meses de abril y septiembre de 2005.

1.2. Características de la dieta

Una vez finalizada la fase de adaptación de los animales, éstos fueron alimentados con un pienso comercial específico para crecimiento y cebo de terneros, cuyos ingredientes y composición química se muestran en la Tabla 1.

Los tres lotes de estudio fueron suplementados con 35 mg/kg de materia seca (MS) de sulfato de cobre (CuSO₄), límite máximo permitido en dietas destinadas a terneros (Reglamento CE N° 1334/2003 de la Comisión del 25 de julio de 2003). La dieta suministrada fue representativa de la que reciben los terneros en cebo intensivo (concentrado y forraje), estando adecuada a las necesidades nutricionales de los mismos (NRC, 2004).

Tabla 1. Composición del pienso utilizado en la alimentación de los terneros (según etiqueta): Pienso complementario para vacuno en fase de crecimiento y cebo. TERNIgranNG (presentación en harina).

CONSTITUYENTES ANALÍTICOS	
Proteína bruta (%)	15,5%
Materias grasas brutas (%)	5,25%
Celulosa bruta (%)	4,27%
Cenizas brutas (%)	5,76%
ADITIVOS	
Vitamina A	10000 UI/kg
Vitamina D3	2000 UI/kg
Vitamina E (α -tocoferol de síntesis)	25 mg/kg
Cobre (Sulfato cúprico pentahidrato)	35 mg/kg
Sacarmyces cerevisiae-CNCM 7077	1,5 x 10 ⁹ UFC
Butilhidroxitolueno E-321	
MATERIAS PRIMAS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL	
Maíz	40%
Cebada	22,1%
Harina de extracción de soja modificada genéticamente	16,7%
Salvado de trigo	8%
Gluten feed de maíz modificado genéticamente	6%
Carbonato cálcico	1,60%
Aceite de soja modificada genéticamente	1,50%
Sal cálcica de ácidos grasos de aceite de palma	1,10%
Melaza de caña de azúcar	1%
Fosfato monocálcico	0,70%
Cloruro sódico	0,60%

Análisis de las dietas

Una vez iniciado el experimento, se realizaron análisis mensuales de las dietas empleadas. De cada partida de pienso introducida se recogían tres muestras representativas, que fueron analizadas previo al consumo de pienso por parte de los animales para comprobar que la suplementación de cobre era correcta, así como valorar los niveles de otros minerales. Asimismo, sirvieron también para comprobar que tanto la composición de la dieta, como las características físico-químicas de la misma eran adecuadas y coincidían con lo certificado por el fabricante.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Mouriscade, Finca Mouriscade, perteneciente al Servicio Agrario de la Diputación Provincial de Pontevedra; laboratorio certificado y de referencia de Galicia para análisis de alimentos animales.

En la siguiente tabla (Tabla 2) presentamos los valores medios de los análisis realizados (n=9). En todo momento el análisis de la dieta coincidió con lo descrito por

el fabricante. La suplementación de cobre fue correcta, los niveles variaron de un mínimo de 26 mg/kg a un máximo de 40 mg/kg.

Tabla 2. Composición de la dieta de los análisis realizados (n=9) (media±ES y rango de valores).

Parámetro analizado	media ±ES	Mín-Máx
CONSTITUYENTES ANALÍTICOS		
Húmedad (%)	12,8±1,11	11,2-13,8
Proteína Bruta (%)	16,8±1,93	15,2-19,1
Fibra Bruta (%)	3,92±0,158	3,70-4,10
Cenizas (%)	5,08±0,657	4,30-5,90
Almidón (%)	39,1±2,96	35,2-41,8
Materia Grasa (%)	3,72±0,918	2,90-4,90
MINERALES		
Calcio (%)	0,618±0,140	0,50-0,78
Sodio (%)	0,264±0,147	0,10-0,41
Potasio (%)	0,820±0,045	0,80-0,90
Magnesio (%)	0,240±0,055	0,20-0,30
Fósforo (%)	0,450±0,051	0,39-0,50
Manganeso (mg/kg)	78,4±13,0	52,0-118
Hierro (mg/kg)	214±13,5	196-231
Zinc (mg/kg)	47,6±9,61	36,0-58,0
Cobre (mg/kg)	34,8±4,93	26,0-40,0

I.3. Parámetros productivos

Durante el ciclo productivo de los animales se evaluó la ingesta media en las diferentes razas, y en cada muestreo se procedió a pesar a los animales y se calculó la ganancia media de peso. En la Tabla 3 aparecen reflejados los datos medios de consumo de pienso y los pesos medios de la canal y de las diferentes vísceras.

Tabla 3. Consumo total de pienso (en kilogramos) y pesos (media±ES en kilogramos) de la canal y distintos órganos de los terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de ambas razas en este estudio.

	raza		
	Rubia gallega	Frisona	Cruces
Consumo de pienso	1230	1444	1330
Peso canal	239±7	201±7	228±8
Peso hígado	4,70±0,18	5,98±0,32	5,19±0,12
Peso riñón	0,397±0,021	0,544±0,018	0,465±0,015
Peso corazón	1,44±0,05	1,69±0,08	1,49±0,04
Peso bazo	0,711±0,041	0,783±0,042	0,660±0,035

II. Toma de muestras

II.1. Sangre

Se tomaron muestras de sangre mensualmente durante todo el ciclo productivo, desde los 3 meses hasta el momento del sacrificio, aproximadamente a los 9-10 meses de edad. La recogida de las muestras tuvo lugar entre abril y septiembre de 2005.

La toma de muestras se realizó siempre a la misma hora de la mañana. Los animales eran pasados por la manga, se pesaban y posteriormente se procedía a la extracción de 40 ml de sangre de cada animal mediante punción de la vena yugular. Se utilizaron agujas estériles (Microlance®, Braun, Barcelona, España) de 1,2 x 40 mm de diámetro y jeringas de 20 ml (Omnifix®, Braun, Barcelona, España). La sangre obtenida se distribuía en tres tipos de tubos Vacutainer®: un tubo con heparina (10 ml) para obtención de plasma y análisis de cobre en sangre entera, un tubo con EDTA (10 ml) para los análisis hematológicos y dos tubos sin aditivos para la obtención de suero (2x10 ml). Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración.

De los tubos con EDTA se tomaba una pequeña alícuota para realizar el estudio hematológico en un analizador automático (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories), después esta muestra se ultracentrifugaba en capilares y se realizaba la lectura del microhematocrito y el valor de proteínas totales por refractometría. El resto de la muestra original se centrifugaba a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener plasma (centrífuga Kubota 2700, *Kubota Corporation*, Tokio), luego se colocaba en tubos eppendorf con la correspondiente identificación y se almacenaban a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

Los tubos con heparina se distribuían en dos tubos de sangre (2,5 ml) que se almacenaba a -20°C hasta su procesamiento laboratorial para la determinación de cobre en sangre entera. El resto de la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos y el plasma obtenido se distribuyó en tubos eppendorf y se almacenó a -20°.

Con respecto a los tubos sin aditivos se procedió a la centrifugación (1200 rpm, 10 minutos), posteriormente el suero se distribuyó en tubos eppendorf y se congeló a -20° C. De estas muestras se realizaron las determinaciones de bioquímica, actividad de ceruloplasmina y concentración de cobre en suero.

II.2. Biopsias hepáticas

Se realizaron biopsias *in vivo* en el momento previo al sacrificio con el objetivo de comprobar la validez de este tipo de muestra para determinar la acumulación intrahepática de cobre.

Para llevar a cabo las mismas se siguió la técnica descrita por Udall et al. (1952) y Larson et al. (1995). El punto de biopsia es entre la 11ª y 12ª costilla en el lado derecho (ver Figuras 1 y 2), a la altura del fin de los procesos transversos de las vértebras lumbares; la incisión se realiza concretamente en el punto resultante de trazar una línea desde la tuberosidad coxal hasta el hombro. En terneros la ubicación del hígado es más cercana a la línea media que en animales adultos, por ello, resulta más fácil si un asistente inmoviliza al animal desde el lado opuesto y lo arquea. El punto a biopsiar se localizó mediante ecografía.

Los animales se inmovilizaron en una manga, la zona de incisión fue rasurada, lavada y posteriormente desinfectada con una solución acuosa de povidona yodada (Betadine®). Se infiltró el área a incidir con 10 ml de lidocaína al 2% (Xilocaina®, laboratorios Ovejero) para insensibilizar la piel y músculos de la zona. Se realizó una incisión de aproximadamente 0,5 cm con el bisturí y posteriormente se introdujo la aguja de biopsia junto al estilete, atravesando los músculos intercostales hasta la superficie del hígado. La dirección de la aguja de biopsia fue craneal y ventral hacia el codo opuesto (izquierdo), más o menos perpendicular a la superficie del cuerpo. Una vez en la superficie del hígado, se removió el estilete y se empujó la aguja a través del lóbulo hepático, cortando la cápsula. El corte del tejido hepático genera una característica crepitación fácil de reconocer. Finalmente se retira la aguja con el trozo de hígado, obteniendo una muestra de aproximadamente 0,05 g. Las muestras fueron colocadas en crioviales y sumergidas en una cántara con nitrógeno líquido (-196°C) hasta su llegada al laboratorio. Una vez allí se traspasaron a un arcón de -80° C hasta su análisis.

A todos los animales biopsiados se les administró un tratamiento antibiótico con penicilina+estreptomicina (Duphaphen® Strip, Fort Dodge) con el fin de prevenir cualquier tipo de infección. Además, y tal como se señaló anteriormente, todos los animales fueron vacunados frente a *Clostridium spp.*

Ningún animal presentó signos de infección, ni reducción en el consumo de alimento a causa de las biopsias.

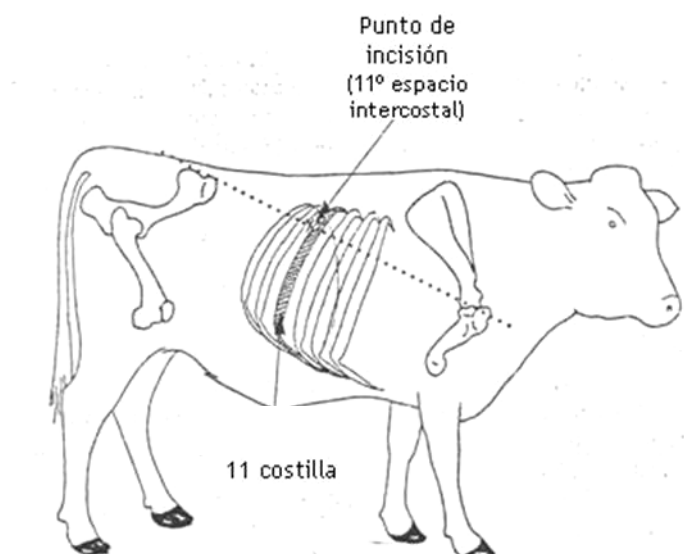


Figura 1. Punto de biopsia hepática (Larson et al., 1995).

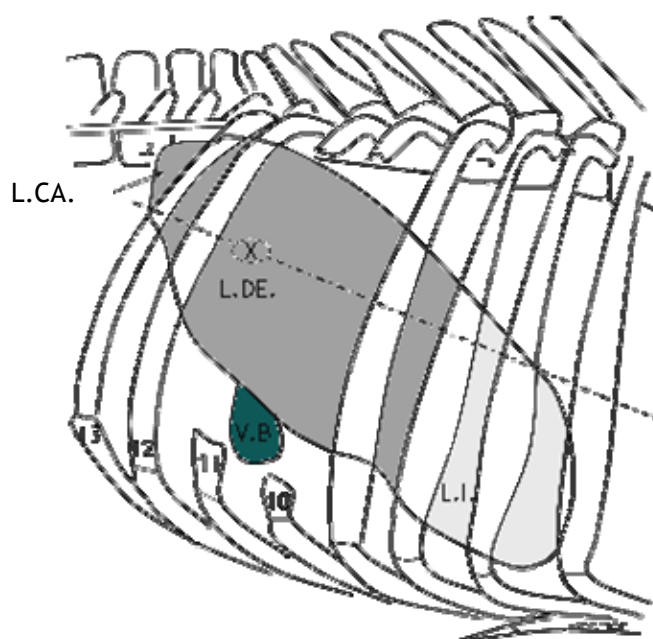


Figura 2. Detalle de punto de biopsia. L.DE.: lóbulo derecho externo; L.I.: lóbulo izquierdo; L.CA.: lóbulo caudado; V.B.: vesícula biliar. (Imagen modificada del Popesko (1998). Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos).

II.3. Toma de muestras de tejidos post mórtem

Una vez concluida la fase experimental, los animales fueron sacrificados en el matadero comercial *Carnicosa*, A Coruña (Galicia, España).

En el momento del sacrificio se realizó un exámen macroscópico de la canal y de las vísceras. Posteriormente las vísceras se pesaron y se procedió de forma ordenada y rápida (antes de que hubiese transcurrido una hora desde el sacrificio) a la recogida de muestras. En la figura 3 se muestra un modelo de la ficha utilizada en la recogida de muestras. Se tomaron muestras de hígado, riñón, cerebro, corazón, bazo y diferentes tipos de músculos (pectoral, diafragma y semitendinoso).

Nº laboratorio:	Fecha sacrificio:
Nº crotal:	Raza:
Peso vivo:	
Peso canal:	
Clasificación canal:	
<hr/>	
HIGADO:	Peso:
Ultracongelar: 3 submuestras	
Lóbulo caudado <input type="checkbox"/>	Lóbulo derecho (biopsia) <input type="checkbox"/>
Muestras:	
Lóbulo caudado <input type="checkbox"/>	Lóbulo derecho externo (biopsia) <input type="checkbox"/>
Lóbulo izquierdo <input type="checkbox"/>	Lóbulo derecho interno <input type="checkbox"/>
Lóbulo cuadrado (central) <input type="checkbox"/>	Apófisis papilar <input type="checkbox"/>
<hr/>	
RIÑÓN:	Peso:
Ultracongelar: 3 submuestras	
Corte central (corteza + médula) <input type="checkbox"/>	
Muestras:	
Riñón derecho <input type="checkbox"/>	
<hr/>	
CEREBRO:	
Ultracongelar: 3 submuestras	
Muestra	
<hr/>	
MÚSCULO:	
Muestras:	
Diafragma <input type="checkbox"/>	
Pectoral <input type="checkbox"/>	
Semitendinoso <input type="checkbox"/>	
<hr/>	
CORAZÓN:	PESO:
Muestra	
<hr/>	
BAZO:	PESO:
Muestra	

Figura 3. Ficha de toma de muestras en matadero.

HÍGADO: una vez pesado el hígado se procedió a la toma de muestras de todos los lóbulos hepáticos, con el objetivo de valorar si la acumulación de cobre era homogénea en todo el órgano.

Se tomaron 6 tipos diferentes de muestras: lóbulo derecho externo (DE), lóbulo derecho interno (DI), lóbulo caudado (CA), apófisis papilar (AP), lóbulo cuadrado (CU) y lóbulo izquierdo (I). De la cara externa o vista peritoneal se tomó una muestra del lóbulo derecho externo (DE) que coincide con el punto de biopsia, y de la cara interna o visceral se tomaron las otras cinco muestras (ver Figura 4). Se procuró siempre tomar las muestras de la misma localización (ver Figura 5). El tamaño de las muestras fue de aproximadamente 7x5 cm.

RIÑÓN: una vez pesados los riñones, se procedió a recoger el riñón derecho.

CEREBRO: las muestras de cerebro se recogieron con la ayuda de una “*cucharilla-espátula*”. La muestra obtenida era de mesencéfalo.

CORAZÓN Y BAZO: se pesaron y se recogieron las correspondientes muestras. La muestra de corazón se tomó del ventrículo izquierdo.

MÚSCULO: la acumulación de cobre varía en función de los diferentes tipos de músculos, los niveles de cobre en músculo diafragmático son significativamente superior que en el músculo pectoral (López-Alonso et al., 2000). Se tomaron muestras de diafragma, músculo pectoral y semitendinoso con el objetivo de valorar si hay diferencias en la acumulación de cobre.

Todas las muestras fueron identificadas, colocadas en bolsas de polipropileno y mantenidas en refrigeración (4°C) hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se limpiaron de grasa, tejido conectivo, y principales vasos sanguíneos. En el caso del riñón, se realizó también una homogeneización para que la muestra fuera representativa de corteza y médula. De cada muestra se tomaron 3 submuestras de 10 g aproximadamente en bolsas de polipropileno y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

Además, para llevar a cabo el estudio de metalotioneínas y de fraccionamiento subcelular se tomaron 3 submuestras de hígado (dos tipos: lóbulo derecho externo y lóbulo caudado), riñón (corte central con médula y corteza) y cerebro que se ultracongelaron en crioviales en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su llegada al laboratorio donde se introdujeron en un arcón de -80°C hasta su posterior análisis laboratorial.

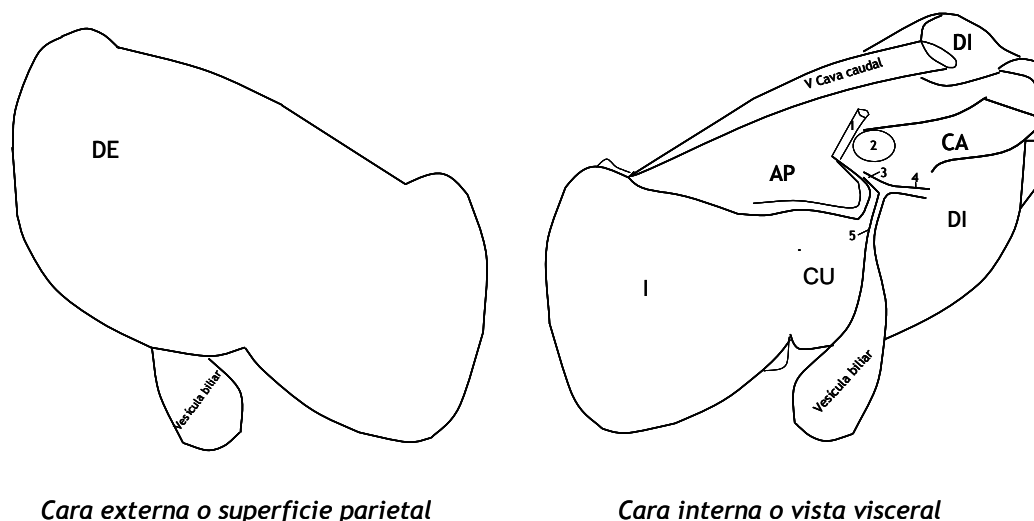


Figura 4. Lóbulos hepáticos. Cara externa: DE: lóbulo derecho externo. Cara interna: DI: lóbulo derecho interno; CA: lóbulo caudado; AP: apófisis papilar; CU: lóbulo cuadrado I: lóbulo izquierdo. 1: arteria hepática; 2: vena porta; 3: conducto hepático; 4: conducto colédoco; 5: conducto cístico. (Imagen modificada del Popesko (1998). Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos).

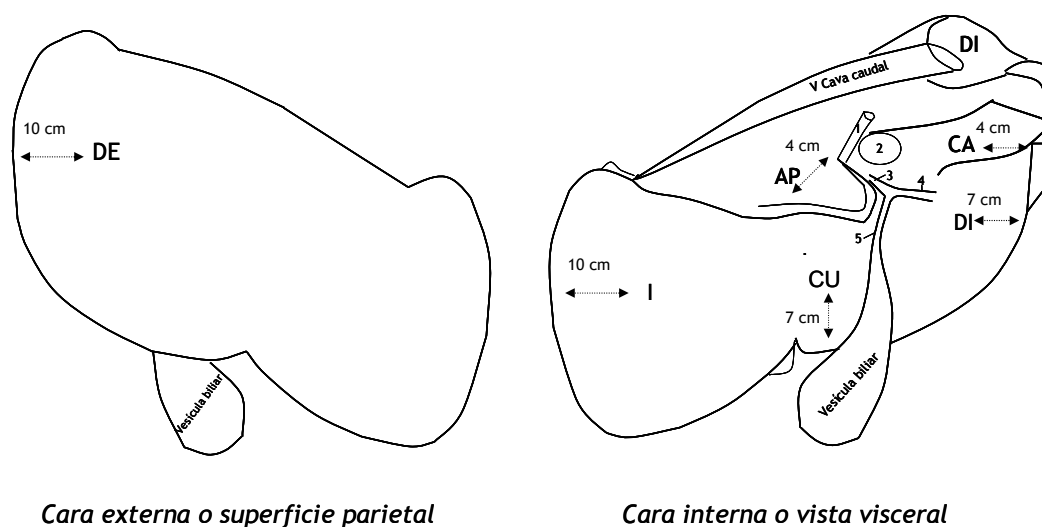


Figura 5. Puntos de toma de muestras. Cara externa: DE: lóbulo derecho externo a 10 cm. Cara interna: DI: lóbulo derecho interno a 10 cm; CA: lóbulo caudado a 4 cm; AP: apófisis papilar a 4 cm caudal a grandes vasos; CU: lóbulo cuadrado a 7 cm I: lóbulo izquierdo a 10 cm. 1: arteria hepática; 2: vena porta; 3: conducto hepático; 4: conducto colédoco; 5: conducto cístico.

III. Determinaciones analíticas

III.1. Hematología

Los parámetros hematológicos (glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), glóbulos blancos (GB) y plaquetas (Plaq)) se realizaron en un analizador automático (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories).

En todos los muestreos se analizaron el microhematocrito y las proteínas totales por refractometría. Los resultados obtenidos de ambos parámetros fueron muy similares a los obtenidos por el contador automático para el hematocrito (CV=2.17%) y por bioquímica húmeda para proteínas totales (CV=5.4%). Por ello, en este estudio se utilizaron los datos de hematocrito obtenidos por el contador automático y de proteínas totales obtenidas por bioquímica húmeda.

III.2. Bioquímica

La determinación de la bioquímica (glucosa, albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (NEFA), urea y creatinina) y la actividad de las enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa (ASAT), creatín quinasa (CK), gamma glutamil transferasa (GGT) y glutamato deshidrogenasa (GLDH)) se llevaron a cabo empleando kits comerciales en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Perkin Elmer® modelo Lambda 2.

III.2.1. Glucosa

La concentración de glucosa en suero se realizó mediante un método colorimétrico de los laboratorios Gernon (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). La glucosa se determina por oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa, y el peróxido de hidrogeno formado, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-aminofenol a un compuesto de color rojo. Este compuesto, proporcional a la cantidad de glucosa presente en el suero, se lee en un espectrofotómetro de absorción UV/Vis a 500nm antes de 60 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dl)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}} \times 100$$

III.2.2. Albúmina

Para su determinación recurrimos al uso de un método colorimétrico suministrado por los Laboratorios HumanH (Alemania). Esta técnica se basa en la reacción del verde bromocresol con la albúmina en tampón citrato, en la cual se forma un complejo coloreado. A continuación se mide su absorbancia en el espectrofotómetro, sabiendo que la absorbancia a 546 nm es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra ensayada.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (g/L)} = 40 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

III.2.3. Proteínas totales

Su determinación también se basa en un método colorimétrico de los laboratorios HumanH (Alemania), fundamentado en la reacción que sufren los iones de cobre con las proteínas en un medio alcalino que da lugar a un complejo de color violeta. La absorbancia de este complejo es proporcional a la concentración de proteína en la sangre. Se utilizó un espectrofotómetro para las mediciones de las absorbancias a una longitud de onda de 546 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (g/L)} = 80 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

III.2.4. Colesterol

La concentración de colesterol en suero se realizó mediante un método enzimático colorimétrico perteneciente a los laboratorios Spinreact (Spinreact, S.A., Barcelona, España). El principio del método es que los ésteres del colesterol son hidrolizados por una colesterol esterasa y el colesterol producido en esta reacción, más el colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa con formación de peróxido de hidrogeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-Aminofenazona/fenol a un compuesto de color rojo. Se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 500 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dl)} = 200 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{Standard}}$$

III.2.5. Triglicéridos

La concentración de triglicéridos séricos se calculó mediante un método enzimático colorimétrico de los laboratorios Spinreact (Spinreact, S.A., Barcelona, España). Los fundamentos del método son que los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerol y ácidos grasos libres, por medio de una combinación especial de lipasas. El indicador es una quinona formada a partir de peróxido de hidrógeno + 4-aminoantipirina y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La

cantidad de quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en el suero. La absorbancia es leída en un espectrofotómetro a 505 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dl)} = 200 \times \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{Standard}}$$

III.2.6. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

En su determinación utilizamos el método colorimétrico suministrado por los Laboratorios Randox® (United Kingdom), basado en las siguientes reacciones a 37 °C: los ácidos grasos libres reaccionan con ATP y coenzima A en una reacción catalizada por la acilCoA sintetasa formando acilCoA, este compuesto es oxidado por la acil-CoA-oxidasa formando peróxido de hidrógeno, éste último se valora al hacerlo reaccionar con N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina y 4-Aminoantipirina, en una reacción catalizada por la peroxidasa, formando un producto púrpura. Se realiza la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible a 550 nm.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mmol/l)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

III.2.7. Creatinina

Para determinar la concentración de creatinina en suero se utilizó un método colorimétrico proporcionado por los laboratorios Gernon (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España) en el cual la creatinina reacciona con el picrato alcalino, según la reacción de Jaffé, para dar un cromógeno rojizo. La cantidad de cromógeno que se forma bajo condiciones controladas, es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra y se mide fotométricamente a 500 nm en un espectrofotómetro a los 30 segundos y a los 150 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dl)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}} \times 2$$

III.2.8. Urea

Para calcular la concentración de urea sérica se utilizó un método colorimétrico de los laboratorios Gernon (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). El principio de la reacción es que la urea es desdoblada por la acción específica de la enzima ureasa en CO₂ y NH₃. En una segunda etapa el NH₃ con el 2-oxoglutarato y el NADH, pasan a dar en presencia de la enzima glutamato dehidrogenasa (GLDH), glutamato y NAD. El consumo de NADH es medido por la disminución de absorbancia a 340 nm y es proporcional a la concentración de urea en la muestra que es leída en un espectrofotómetro a los 60 segundos y a los 120 segundos.

$$C_{\text{muestra}} \text{ (mg/dl)} = \Delta \text{ Abs}_{\text{muestra}} \times 50 / \Delta \text{ Abs}_{\text{standard}}$$

III.2.9. Aspartato amino transferasa (ASAT)

Para la determinación de la actividad aspartato aminotransferasa en suero empleamos un test cinético de los Laboratorios Gernon (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). El principio de la técnica se basa en que la enzima cataliza la reacción entre 2-oxoglutarato y L-aspartato, dando lugar a oxalacetato, el cual reacciona con NADH en presencia de malato deshidrogenasa, formándose malato y NAD^+ . Los incrementos de absorbancia que experimenta la muestra se miden en un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible, a una longitud de onda de 340 nm a intervalos de 1 minuto durante 3 minutos. Se calcula el incremento de absorbancia media por minuto y la actividad enzimática en la muestra se estima empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} (\text{UI/L}) = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{minuto} \times 952$$

III.2.10. Creatin kinasa (CK)

Para la determinación de la actividad creatín quinasa en suero empleamos un test cinético de los Laboratorios Gernon (Gernon, RAL Técnica para el Laboratorio, Barcelona, España). El principio de la técnica se basa en que la enzima CK cataliza la fosforilación reversible de ADP, en la presencia de fosfato creatino, para formar ATP y creatina. A su vez, la Hexokinasa (HK) cataliza la fosforilación de glucosa por el ATP formado para producir ADP y glucosa-6-fosfato (G-6-P). El G-6-P es oxidado a 6-fosfogluconato con producción derivada a NADH. La variación de la formación de NAHD, medida con un espectrofotómetro a 340 nm a intervalos de 1 minuto durante 4 minutos, es directamente proporcional a la actividad del suero CK.

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} (\text{UI/L}) = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{minuto} \times 3375$$

III.2.11. Gamma glutamil transferasa (GGT)

Para la determinación de la actividad gamma glutamil transferasa en suero empleamos un test cinético de los Laboratorios Spinreact (Spinreact, S.A., Barcelona, España). El principio de la técnica se basa en que la enzima cataliza la reacción entre el L-gamma-glutamyl-3-carboxi-p-nitroanilinda y glicilglicina en la que se forma L-gamma-glutamylglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. Los incrementos de absorbancia que experimenta la muestra se miden en un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible, a una longitud de onda de 405 nm a intervalos de 1 minuto durante 4 minutos. Se calcula el incremento de absorbancia media por minuto y la actividad enzimática en la muestra se estima empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} (\text{U/L}) = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{minuto} \times 1190$$

III.2.12. Glutamato dehidrogenasa (GLDH)

Para la determinación de la actividad glutamil dehidrogenasa en suero empleamos un test cinético de los Laboratorios Randox® (United Kingdom). La medición de esta enzima se basa en una reacción no específica por la cual el α -oxoglutarato + NADH + NH₄ sufren una reacción de oxidación por la actividad de la GLDH dando como productos glutamato + NAD⁺ + H₂O. Este NADH oxidado produce una disminución en la absorbancia por minuto que es medida con un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible a 340 nm que es proporcional a la actividad de la enzima GLDH.

$$\text{Actividad}_{\text{muestra}} \text{ (UI/L)} = \Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} \times 197$$

Control de calidad analítica

Durante todo el experimento se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. En cada ciclo de análisis se introdujeron muestras patrón o de referencia (Gernon control para química clínica, suero bovino ensayado nivel 2 de Randox, Humanrol N: suero para control de calidad y calibración en química clínica, Spinrol "H" normal de Spinreact) para comprobar la precisión y exactitud del método. En la Tabla 4 aparecen los resultados del control de calidad, como puede observarse los resultados obtenidos coinciden con los niveles certificados.

Tabla 4. Control de calidad de los parámetros bioquímicos (n=18).

Parámetro	Niveles analizados (media±ES)	Niveles certificados (rango)
Glucosa (mg/dl)	98,3±1,12	76,2-105
Albúmina (g/dl)	3,11±0,073	2,35-3,39
Proteínas totales (g/dl)	4,91±0,062	4,31-5,17
Colesterol (mg/dl)	148±5,11	121-175
Triglicéridos (mg/dl)	101±1,61	97-133
NEFA (mmol/l)	3,03±0,416	2,32-3,14
Urea (mg/dl)	36,1±0,923	30-46,8
Creatinina (mg/dl)	0,55±0,025	0,43-0,63
ASAT (UI/l)	35,7±1,56	30,6-49
CK (UI/l)	185±2,60	162-242
GGT (UI/l)	7,31±0,184	6,04-8,92
GLDH (UI/l)	11,5±0,248	9-14

III.3. Determinación de los niveles de ceruloplasmina

Los estudios de la actividad ceruloplasmina se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Perkin Elmer modelo Lambda 2.

La determinación de la actividad ceruloplasmina en suero se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Suderman y Nomoto (1970).

Principio

A pH 5.4, la ceruloplasmina cataliza la oxidación de la p-fenilenediamina dando lugar a un color púrpura intenso. El grado de formación de este producto de oxidación con color es proporcional a la concentración de ceruloplasmina en suero y se realiza una corrección para la oxidación no-enzimática de la p-fenilenediamina. La inhibición de la oxidación no-enzimática de la p-fenilenediamina se consigue mediante el empleo de azida sódica.

Reactivos

- Solución de acetato sódico 0.2 M.
- Solución de ácido acético 0.2 M.
- Tampón acetato 0.1 M, pH 5.45 a 37°C. Transferir a un frasco volumétrico 430 ml de la solución de acetato sódico 0.2 M, 70 ml de la solución de ácido acético 0.2 M y aproximadamente 400 ml de agua bidestilada. Calentar a 37 °C en un baño de agua y ajustar el pH a 5.45 (5.40-5.50) añadiendo acetato sódico o ácido acético, y enrasar a un volumen final de 1 litro.
- Solución de azida sódica 1.5 M.
- Solución de p-fenilenediamina tamponada: Inmediatamente antes de usar, pesar 0.500 g de p-fenilenediamina dihidroclorito ($C_6H_4(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ (características producto) y transferir a un frasco volumétrico de 100 ml, disolviéndolo en aproximadamente 75 ml de la solución de tampón acetato (pH 5.45) calentada a 37 °C. El contenido del frasco se ajusta a un pH de 5.45 a 37°C empleando una solución de hidróxido sódico 1M y a continuación se enrasa a 100 ml empleando tampón acetato. La solución es estable 3 horas.

Procedimiento

- Para cada muestra pipetear 2 ml de tampón acetato en dos tubos de ensayo rotulados como R (reacción) y B (blanco).
- Añadir 0.1 ml de suero a cada tubo.

- Colocar los tubos en un baño a 37°C, junto con la solución de p-fenilenediamina hasta que alcancen un equilibrio térmico.
- Añadir 1 ml de la solución de p-fenilenediamina a cada tubo, mezclar bien y mantener sin tapar en el baño de agua durante 5 minutos. El baño debe estar tapado para evitar la exposición de los tubos a la luz.
- Añadir 50 µl de la solución de azida sódica en el tubo B, mezclar bien y colocar de nuevo en el baño de agua.
- Exactamente 30 minutos más tarde, añadir 50 µl de la solución de azida sódica en el tubo R y mezclar bien.
- Las muestras R y B se transfieren a cubetas de espectrofotómetro y la absorbancia se mide a 530 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible Perkin Elmer (modelo Lambda 2). El color de las muestras permanece estable durante 6 horas.

Cálculo de la actividad ceruloplasmina

$$\text{Ceruloplasmina (g/l)} = 0.752 (A_R - A_B)$$

Donde A_R = absorbancia de la muestra y A_B = absorbancia del blanco

Control de calidad analítica

Durante todo el experimento se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. La precisión del método, calculada como la desviación estándar relativa (% DSR) de la lectura de absorbancia de una muestra de referencia interna (suero bovino) fue 6,13.

III.4. Determinación de los niveles de cobre y zinc por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES)

Preparación de las muestras

Todas las muestras de tejidos (hígado, riñón, cerebro, bazo, corazón y músculo) (2 gramos aproximadamente) y sangre (2 ml) se pesaron de forma precisa en los vasos de digestión utilizando una balanza electrónica SALTER-AND, modelo ER-60A. La digestión ácida de las muestras se realizó en un sistema de microondas marca Milestone Ethos Plus, equipado con vasos de alta presión. A cada muestra se le añadieron 5 ml de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck), 2 ml de peróxido de hidrógeno 30 % p/v y 1 ml de agua ultrapura. A continuación se cerraron los vasos y se sometieron a un proceso de digestión cuyas características aparecen reflejadas en la Tabla 5. La solución resultante se diluyó con agua ultrapura hasta un

volumen final de 25 ml y se almacenó en tubos de polipropileno hasta su posterior análisis químico.

En el caso de las biopsias las muestras eran de menor tamaño (aproximadamente 50 mg), y por ello para mejorar el límite de cuantificación se realizó una digestión ácida en una batería de digestión en vez de hacerlo en microondas. Las muestras de biopsia se pesaron (balanza electrónica SALTER-AND, modelo ER-60A) de forma precisa en tubos de digestión pirex (de 50 ml de capacidad) y se secaron en una estufa (Selecta, modelo 210) hasta que alcanzaron un peso constante (24 horas aproximadamente). A cada muestra se le añadieron 1 ml de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck), permitiendo una digestión fría de las mismas durante 24 horas. Posteriormente las muestras se colocaron en un bloque termostático (Selecta Multiplaces) a $120\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos y se añadieron 1 ml de peróxido de hidrógeno 30 % p/v para completar la digestión de la materia orgánica durante otros 60 minutos. La solución resultante se diluyó con agua ultrapura hasta un volumen final de 5 ml.

La preparación de las muestras de suero para la determinación de los niveles de cobre se llevó a cabo por dilución en la proporción 1:4.

Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura con una resistividad específica de $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, obtenida a través de un sistema de purificación de agua Millipore (modelo Milli-Q Plus) inmediatamente antes de su uso.

Tabla 5. Programa de digestión empleado para la digestión ácida de las muestras empleando un microondas marca Milestone (modelo Ethos Plus).

	Paso	Tiempo	Temperatura	Potencia
Vísceras	1	5 minutos	180°	1000 W
	2	10 minutos	180°	1000 W
Sangre	1	2 minutos	85°	1000 W
	2	2.5 minutos	135°	1000 W
	3	4.5 minutos	230°	1000 W
	4	15 minutos	230°	1000 W

Determinación de los niveles de cobre y zinc por ICP-OES

La determinación de los niveles de cobre y zinc en las distintas muestras analizadas se llevó a cabo por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES). Los análisis se realizaron en el Laboratorio FISQITECNAL perteneciente a los Servicios Centrales de la Universidad de Santiago de Compostela. Las condiciones

analíticas aparecen reflejadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones instrumentales para el análisis por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES).

Potencia	1 Kw
Flujo de plasma	15 l/min
Flujo gas auxiliar	1.5 l/min
Presión nebulizador	150 Kilopascales
Velocidad muestra	25 rpm

Cálculo de las concentraciones de metales en las muestras

Para calcular la concentración de los metales analizados en las muestras se empleó la siguiente formula:

$$K = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

Donde K = concentración en la muestra (mg/kg o mg/l en sangre), a = concentración en la solución ($\mu\text{g/l}$ o mg/l), b = concentración media del blanco ($\mu\text{g/l}$ o mg/l), V = volumen final de la muestra (ml), m = peso de la muestra (g) o volumen para la sangre (ml).

Control de calidad analítica

Durante todo el estudio se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. En cada lote de 10 muestras se incluía un blanco y una muestra de material de referencia certificado.

El límite de detección en la digestión ácida se calculó como tres veces la desviación standard de los blancos (Tabla 7). Los límites de cuantificación, expresados como la concentración de cada analito en el tejido (peso fresco) se calcularon teniendo en cuenta el peso de la muestra y la disolución empleada.

Tabla 7. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) y resultados del análisis del material certificado de referencia (Pig Kidney CRM 186) expresados en mg/kg .

Elemento	Límite de detección	CRM (Pig Kidney CRM 186) *		
		Niveles certificados (media \pm 95%IC)	Niveles analizados (media \pm 95%IC)	Porcentaje de Recuperación (%)
Cu	1.4	31.9 \pm 0.4	28.6 \pm 2.1	90%
Zn	6.0	128 \pm 3	111 \pm 6	87%

Los estudios de recuperación analítica se llevaron a cabo empleando un material de referencia certificado (Pig Kidney CRM 186, BCR Reference Materials). Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 7 y, en general, se observa que los valores determinados en este estudio son muy próximos a los valores certificados, lo que demuestra la exactitud del método y asegura que no se producen ni pérdidas ni contaminación de las muestras durante todo el proceso. En el caso de las muestras de sangre y suero los estudios de recuperación analítica se realizaron mediante el empleo de muestras añadidas de forma que se consiguiesen valores de absorbancia entre 2-10 veces por encima de los niveles de concentración esperados en dichas muestras; en todos los casos los valores de recuperación se situaron entre el 91 y 97%.

III.5. Determinación de los niveles de metalotioneínas

III.5.1. Determinación de los niveles de metalotioneínas en hígado, riñón y cerebro

La concentración de metalotioneínas se determinó empleando una modificación del método de saturación de plata (Scheuhammer y Cherian, 1991).

El método de saturación de plata para la determinación de metalotioneínas en tejidos se desarrolló como una modificación del método de saturación de cadmio (Scheuhammer y Cherian, 1986), con el objetivo de mejorar la precisión analítica cuando se determina la concentración de metalotioneínas en tejidos donde una elevada proporción de cobre (u otros metales de gran afinidad hacia estas metalotioneínas) pueden estar presentes en elevadas concentraciones.

Principio

La estimación de metalotioneínas por el método de saturación de plata se basa en la gran afinidad de los iones de plata (Ag^+) para ligarse a estas metaloproteínas junto

con la gran estabilidad térmica de estas proteínas en comparación con otros ligandos citosólicos. La adición de un exceso de Ag^+ a la muestra da lugar a un desplazamiento de otros metales presentes en las metalotioneínas así como la saturación de las mismas por dicho metal. La adición de hemoglobina a la muestra elimina la Ag^+ de otros ligandos distintos de las metalotioneínas. A continuación se realiza un tratamiento de calor donde se precipita la hemoglobina ligada a Ag^+ . La repetición de la adición de la hemoglobina completa el proceso de eliminación del exceso de Ag^+ y otros ligandos de plata, y como consecuencia el sobrenadante resultante contiene exclusivamente Ag^+ ligado a metalotioneínas. La concentración de metalotioneínas se calcula teniendo en cuenta la concentración de plata en el sobrenadante y el número de posiciones ocupadas por este metal en cada molécula de metalotioneínas.

Reactivos e Instrumental analítico

- Sacarosa (0.25 M).
- Glicina (0.5 M): Ajustar a pH 8.5 con NaOH 4N.
- AgNO_3 (9.27 mM; 1000 $\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$): Esta solución *stock* se debe almacenar en una botella oscura cubierta con papel de aluminio para protegerla de la luz debido a la fotosensibilidad del Ag^+ . Las soluciones de trabajo (20 $\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$ en Tampón glicina) se prepararán semanalmente y se guardarán en botellas oscuras.
- Hemoglobina bovina (Sigma H-2625).

Preparación de las muestras

Para la determinación de la concentración de metalotioneínas se emplearon muestras de citosol (hígado, homogeneizado renal y cerebro). Para ello, aproximadamente 0.5 gramos de tejido eran homogeneizados en 4 volúmenes de sacarosa 0.25 M (pH 8.4, 4°C) empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem. Las muestras se centrifugaron a 18.000xg durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se ultracentrifugó a 105.000xg durante 1 hora para obtener el citosol (Scheuhammer y Cherian, 1991; Suzuki et al., 1994).

Procedimiento

- Alícuotas de entre 0.1 y 0.5 ml de cada citosol y se ajustaron a un volumen de 2.4 ml con Glicina 0.5 M (pH 8.5). La completa saturación de las muestras se aseguraba usando varias alícuotas de la misma muestra.
- Añadir 1 ml de una solución de AgNO_3 (20 $\mu\text{g Ag}^+/\text{ml}$ tampón de glicina) e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Añadir 0.2 ml de solución de hemoglobina al 2% en tampón y mezclar bien.
- Calentar en un baño de agua (aproximadamente 100°C durante 1 minuto).

- Centrifugar a 1000xg durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir de nuevo la solución de hemoglobina y el tratamiento de calor 2 veces.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur transferir el sobrenadante resultante a un tubo de ensayo y centrifugar a 15.000xg durante 10 minutos.
- Medir la concentración de plata en el sobrenadante resultante por ICP-OES.

Cálculo de la concentración de metalotioneínas

La concentración de plata en el sobrenadante final es proporcional a la cantidad de metalotioneínas presentes en la muestra. Scheuhammer y Cherian (1991) han establecido que en las condiciones del ensayo 1 mol de metalotioneínas tiene una capacidad para fijar 17 moles de plata, lo que indica que 1 µg Ag representa 3.55 µg de metalotioneínas. La concentración de metalotioneínas en la solución se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Metalotioneínas (µg/g tejido)} = \frac{(C_{Ag} - C_b) \times 3.55 \times V_f \times FDM}{V_m}$$

Donde C_{Ag} = concentración de plata en la muestra, C_b = concentración de plata en el blanco, V_f = volumen final en el ensayo, FDM = factor de dilución de la muestra, dependiente del peso exacto de la muestra y del volumen de homogeneización, V_m = volumen de muestra empleado.

Control de calidad analítica

En cada lote de seis muestras se incluyó un blanco y un material de referencia interno (homogeneizado de hígado vacuno ultracongelado) con el objetivo de detectar posible contaminación y monitorizar la consistencia del análisis a lo largo del experimento. El límite de detección, expresado como la concentración de metalotioneínas en el tejido y basado en el peso medio de la muestra fue de 21.8 mg/kg peso fresco; todas las muestras presentaron concentraciones de metalotioneínas por encima del límite de detección. La precisión del método, calculada como la desviación estándar relativa (% DSR) de la lectura de absorbancia del material de referencia interno, fue de 3,05.

III.5.2. Determinación de las concentraciones de cobre y zinc ligadas a metalotioneínas

Se determinaron las concentraciones de cobre y zinc ligadas a metalotioneínas en hígado. La concentración de cobre ligada a metalotioneínas se asume que es aquella presente en el sobrenadante (citósol hepático) después de someterlo a un tratamiento térmico (Suzuki *et ál.*, 1994).

Procedimiento

Para obtener dicho sobrenadante se calentó 1 ml de muestra (citosol hepático) a 72 °C durante 5 minutos y a continuación se colocó en un baño de hielo. Las proteínas desnaturalizadas por el calor se eliminaron por centrifugación de la muestra a 1600xg durante 5 minutos. Las concentraciones de cobre y zinc se determinó por ICP-OES tal y como se ha descrito anteriormente.

Control de calidad analítica

En cada lote de seis muestras se incluyó un blanco y un material de referencia interno (homogeneizado de hígado vacuno ultracongelado) con el objetivo de detectar posible contaminación y monitorizar la consistencia del análisis a lo largo del experimento. El límite de detección, expresado como la concentración de metal en el tejido y basado en el peso medio de la muestra fue de 0.315 y 0.147 mg/kg para cobre y zinc respectivamente; todas las muestras presentaron concentraciones de cobre y zinc por encima del límite de detección. La precisión del método, calculada como la desviación estándar relativa (% DSR) de la lectura de absorbancia del material de referencia interno, fue de 6.04 y 4.63 para cobre y zinc respectivamente.

III.5.3. Determinación de las concentraciones de cobre a nivel subcelular empleando técnicas de centrifugación diferencial

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo empleando una adaptación de la técnica descrita por Corbett *et al.* (1978).

Homogeneización y fraccionamiento subcelular

Aproximadamente 1 gramo de hígado se homogeneizó en 6 volúmenes de sacarosa 0.25 M (pH 8, 4°C) utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem.

El homogeneizado hepático y los subsiguientes sobrenadantes se centrifugaron (centrífuga Beckham, modelo J2-21) a 600xg durante 10 minutos para separar el pellet nuclear (núcleo, membranas plasmáticas, células sin romper) y a 8500xg durante 12 minutos para separar el pellet granular (mitocondrias y lisosomas). El sobrenadante resultante se untracentrifugó (ultracentrífuga Beckman, modelo L7-80, rotor 70 Ti) a 105.000xg durante 60 minutos para separar el pellet microsomal (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, ribosomas) del citosol (que incluye el cobre ligado a metalotioneínas, otras proteínas citoplasmáticas e iones libres).

Determinación de la concentración de cobre total en el hígado y en las distintas fracciones subcelulares

Distintas sub-muestras (entre 0.5-1 ml) de homogeneizado hepático y distintas subfracciones se digirieron en 1 ml de ácido nítrico (Suprapur, Merk) y 0.2 ml de

peróxido de hidrógeno al 30%. Las muestras digeridas se transfirieron a tubos de polipropileno y se diluyeron hasta 5 ml con agua ultrapura. La concentración de cobre se determinó por ICP-OES tal y como se ha descrito previamente.

Control de calidad analítica

Durante todo el estudio se llevó a cabo un estricto programa de control de calidad analítica. Para detectar una posible contaminación así como la consistencia del análisis a lo largo de los diferentes lotes de muestras, se incluyó el análisis de dos blancos y un material de referencia interno (homogeneizado de hígado vacuno ultracongelado) en cada lote de seis muestras. Se analizó además una muestra de material de referencia certificado (Pig Kidney CRM 186) en cada lote para determinar las recuperaciones analíticas. La lectura de absorbancia de los blancos se restó al valor de las muestras para calcular los resultados. El límite de detección (LD) en la digestión ácida fue de 3,81 µg/l para cobre; todas las muestras presentaron concentraciones por encima de estos valores. La precisión de todo el método se calculó como la desviación estándar relativa (% DSR) de las lecturas de absorbancia del material de referencia interno; estos valores para las distintas subfracciones se situaron entre 10,7-13,4 %. Las recuperaciones analíticas (media±DS) del CRM fueron 98,2±7,31 %.

IV. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.14.0), licencia concedida por la Universidade de Santiago de Compostela. La normalidad de los datos se comprobó empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y en los casos donde fue necesario, los datos se transformaron logarítmicamente antes de su análisis.

La influencia de la raza sobre los parámetros analizados en este estudio a lo largo del periodo productivo se evaluó mediante un Modelo General Lineal (MGL) de medidas repetidas, donde la variable raza fue considerada como efecto principal fijo (diseño intersujetos) y los distintos muestreos (diseño intrasujetos) como medidas repetidas.

La influencia de la raza sobre la acumulación de cobre en los diferentes tejidos analizados, así como sobre la concentración de metalotióneínas y el contenido de cobre en las diferentes fracciones subcelulares a nivel hepático se evaluó mediante un análisis de varianza de una vía.

La relación entre la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos y entre las biopsias hepáticas, así como la asociación entre la concentración hepática de cobre y las enzimas marcadoras de daño hepático se evaluó mediante el empleo del coeficiente de correlación de Pearson.

La relación entre las concentraciones de metalotioneínas y la la acumulación hepática de cobre y zinc, así como entre la acumulación de cobre en las distintas subfracciones celulares en relación al contenido total de cobre en el hígado se evaluaron mediante análisis de regresión (Willians, 1993).

En todos los casos se estableció la existencia de diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

Capítulo I

Evaluación de los niveles de cobre en sangre durante el ciclo productivo

Dentro del torrente sanguíneo la determinación del estatus de cobre en el animal se puede llevar a cabo evaluando diversos parámetros, y debemos tener en cuenta que la información que aporta cada uno de ellos es diferente (Wikse et al., 1992; Tessman et al., 2001; Minatel y Carfagnini, 2002). Los parámetros más utilizados son la concentración de cobre en plasma, suero y la actividad de la ceruloplasmina. Estas variables no son siempre un reflejo agudo del estatus de cobre en los animales, sobre todo cuando manejamos rangos cercanos a la marginalidad o deficiencia. El laboratorio de diagnóstico, de forma habitual, se basa en los niveles de cobre en hígado, y también en la concentración de cobre en plasma o suero. El cobre del organismo es principalmente almacenado en el hígado, es por esto, que ante situaciones de desequilibrio (déficit o exceso), las concentraciones de cobre en sangre se mantienen a expensas de las movilizaciones hepáticas o de la distribución de cobre a otros tejidos, originando datos erróneos del estatus de cobre del animal si solo son medidos en sangre. En un primer momento se puso especial atención en “diagnosticar” las deficiencias de cobre a través de los parámetros sanguíneos, pero en los últimos años se advirtió la importancia de “prevenir” las patologías causadas por el cobre a través de la *monitorización* del estatus de minerales de los animales. Debido a que las muestras sanguíneas son de fácil obtención comparadas con las muestras de hígado en el animal vivo, hay una tendencia a utilizar la concentración de cobre en sangre o suero para monitorizar el estatus de los animales o sus respuestas a los tratamientos.

En ganado ovino, el metabolismo del cobre a nivel sanguíneo ha sido ampliamente estudiado y se ha constatado que existen diferencias raciales importantes en cuanto a los niveles de cobre en suero o plasma. Este hecho ha llevado a la selección de líneas genéticas con niveles de cobre altos y bajos dentro incluso de una misma raza, permitiendo una adaptación de los animales a condiciones de deficiencia o toxicidad de este metal (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002). En ganado vacuno, por el contrario, aunque trabajos previos indican que puede haber diferencias raciales en el metabolismo de cobre a nivel sanguíneo (Du et al., 1996), la información de la que se dispone es muy limitada.

El objetivo de este capítulo es evaluar la influencia de la raza sobre diversos parámetros sanguíneos indicadores del estatus de cobre en ganado vacuno a lo largo del ciclo productivo (crecimiento y cebo).

Material y métodos

Muestras

Para este estudio se emplearon muestras de sangre recogidas a intervalos de tiempo mensuales durante todo el ciclo productivo, desde los 3 meses de vida hasta el momento de sacrificio a los 9-10 meses de edad aproximadamente. Los datos correspondientes a los distintos muestreos aparecen reflejados en el capítulo de material y métodos.

Métodos

La determinación de las concentraciones de cobre en sangre entera y en suero se realizó por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES). Las muestras de sangre entera se sometieron a una digestión ácida en microondas y las muestras de suero se diluyeron en una proporción 1:4 inmediatamente antes de su análisis.

La determinación de la actividad ceruloplasmina en suero se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Suderman y Nomoto (1970).

Los detalles de los métodos analíticos empleados, así como el control de calidad analítica llevado a cabo durante el experimento, aparecen descritos en detalle en el apartado de material y métodos.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.14.0). La distribución normal de los datos se chequeó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. La influencia de la raza sobre los parámetros analizados en este estudio a lo largo del periodo productivo considerado se evaluó mediante un Modelo General Lineal (MGL) de medidas repetidas, donde la variable *raza* fue considerada como efecto principal fijo (diseño intersujetos) y los distintos muestreos (diseño intrasujetos) como medidas repetidas.

En todos los casos se estableció la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un valor $p < 0,05$

Resultados

Concentraciones de cobre en suero

En la Tabla 1 aparecen reflejadas las concentraciones de cobre en suero en los terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de los mismos a lo largo de todo el estudio.

Las concentraciones medias de cobre en suero en los distintos grupos se situaron dentro de los niveles fisiológicos para esta especie animal ($>0,475\text{mg/l}$; Suttle, 1993). De forma individual debemos señalar que en un 20% de las muestras analizadas los animales presentaron niveles de cobre en suero por debajo del valor de normalidad considerado por Suttle (1993), siendo el valor mínimo descrito de $0,224\text{ mg/l}$ para un ternero de raza Frisona en el tercer muestreo correspondiente a los 5 meses de edad. Por el contrario, ningún animal en nuestro estudio presentó niveles de cobre en suero por encima de 3 mg/l , nivel considerado como indicativo de toxicidad en ganado vacuno (Bidewell et al., 2000), siendo la mayor concentración de cobre determinada en nuestro estudio de $1,39\text{ mg/l}$ en un ternero cruce a los 4 meses de vida.

Al evaluar el efecto de la raza sobre los niveles de cobre en suero observamos que no fue un factor significativo en el análisis ($F_{2,11}=0,711$; $p=0,512$). Las tres razas mostraron una distribución semejante para la concentración media de cobre en suero pero con variaciones de hasta un 21% entre razas para un mismo muestreo (Tabla 1). De las concentraciones de cobre en suero a lo largo de todo el estudio podemos señalar que los terneros de raza Frisona presentan en todos los muestreos los valores medios de cobre más bajos, mientras que las concentraciones medias de cobre en suero más elevadas aparecen en los terneros cruce durante los primeros muestreos y en los de Rubia gallega a partir de los 6 meses de edad (Tabla 1). Los terneros cruces son asimismo el grupo que presenta el mayor número de animales con niveles de cobre en suero por debajo de la normalidad, con un 42% en el total de los muestreos, seguidos por la raza Frisona con un 40% y por último la raza Rubia gallega que solo cuenta con un 18% de animales por debajo del valor mínimo de cobre en suero descrito por Suttle (1993).

Al considerar la variación intrasujeto a lo largo del experimento observamos que no fue un factor significativo en el análisis para las concentraciones de cobre en suero ($F_{4,5}=3,908$; $p=0,061$) aunque existe una cierta tendencia en cuanto a su evolución a lo largo del ciclo productivo de los animales para los tres grupos considerados (Tabla 1). De forma general podemos señalar que las tres razas presentan una distribución semejante con un descenso entre el primer y tercer muestreo, correspondiente a los tres y cinco meses de edad, desde una concentración media de cobre en suero de $0,769$ a aproximadamente $0,600\text{ mg/l}$ en el conjunto de los animales, concentración

que se mantiene prácticamente constante hasta los 7 meses de edad, y tiende a incrementarse en los últimos meses de vida (Figura 1).

Concentraciones de cobre en sangre entera

En la Tabla 2 aparecen reflejadas las concentraciones de cobre en sangre entera en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas a lo largo de todo el estudio.

Las concentraciones medias de cobre en sangre entera de las distintas razas consideradas en este estudio se situaron dentro de los niveles fisiológicos para los rumiantes ($>0,667$ mg/l; Suttle, 1993). Únicamente un 6,4% de los animales presentaron valores inferiores a dicho valor, y dentro de éstos los de raza Rubia gallega representan el 46%.

Al evaluar el efecto de la raza sobre los niveles de cobre en sangre entera observamos que no fue un factor significativo en el análisis ($F_{2,19}=0,447$; $p=0,646$). Las tres razas mostraron unos niveles de cobre similares, con unas diferencias en la concentración media de cobre en sangre que no superan el 15% de variación entre ellas (muestreo 2). A pesar de no existir diferencias significativas en los niveles de cobre en sangre entre razas, y al igual que sucede con los niveles de cobre en suero, los terneros de raza Frisona son en general los que presentan las menores concentraciones medias de cobre en sangre a lo largo del periodo de estudio. Asimismo, podríamos señalar que los cruces entre ambas razas muestran la mayor variación individual dentro del grupo, observándose un comportamiento opuesto en cuanto a su evolución a los de raza Frisona y Rubia gallega en varias de las tomas.

Al considerar la variación intrasujeto a lo largo de nuestro estudio, observamos por el contrario que se produce una evolución estadísticamente significativa en las concentraciones de cobre en sangre ($F_{4,5}=9,751$; $p=0,000$). De forma general podemos señalar que ocurre un descenso significativo en las concentraciones medias de cobre en sangre entera, desde un valor medio de cobre en el conjunto de los animales de 0,996 mg/l al inicio del experimento hasta 0,774 mg/l en la toma correspondiente a los 9 meses de vida de los terneros (Figura 1). La mayor variación se produce entre los 5 y 6 meses de vida donde ocurre un descenso significativo ($p < 0,05$) en los niveles de cobre en sangre. Este patrón de comportamiento es muy similar en todas las razas durante la etapa de crecimiento, a excepción de la toma 2 que corresponde a los 4 meses de edad de los animales, donde observamos que los niveles de cobre en sangre disminuyen para las razas Rubia gallega y Frisona contrariamente a lo que ocurre con los cruces (Tabla 2). A partir de este momento todas las razas continúan con un comportamiento homogéneo que tiende al descenso de los valores de cobre en sangre a medida que aumenta su edad.

Concentración de ceruloplasmina en suero

En la Tabla 3 aparecen reflejadas las actividades de ceruloplasmina en suero en terneros de razas Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas a lo largo de todo el estudio.

Las actividades medias de ceruloplasmina en suero en los distintos grupos se situaron dentro de los niveles considerados fisiológicos para esta especie animal (0,090-0,250 mg/l; Puls, 1994). Al considerar de forma individual las concentraciones de ceruloplasmina determinadas en nuestro estudio, debemos señalar que en ninguna muestra analizada los niveles se situaron por debajo de los valores de normalidad, si bien un 30% de los animales presentaron valores superiores a dicha referencia (>0,250 mg/l). La raza Rubia gallega representa el 36% de estos valores, seguidos por los cruces y Frisones con un 31% cada uno.

Al evaluar el efecto de la raza sobre los niveles de ceruloplasmina en suero observamos que no existe una influencia significativa en este análisis ($F_{2,12}=0,076$; $p=0,927$). Sin embargo, en general podríamos afirmar que los terneros de raza Frisona, al igual que sucedía con la concentración de cobre en suero y sangre, son los que presentan una menor actividad ceruloplasmina y los de Rubia gallega una mayor actividad, mostrando los cruces una posición intermedia entre ambas razas. Además, debemos señalar que los cruces se comportan de forma opuesta a los terneros de raza Rubia gallega y Frisona en la mayor parte de las tomas de nuestro experimento (Tabla 3).

Al considerar la variación intrasujeto a lo largo de todo el estudio observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ceruloplasmina en suero a lo largo de la fase experimental ($F_{4,5}=0,864$; $p=0,563$) mostrando valores muy similares durante todo el crecimiento, con una diferencia de un 12% entre el valor máximo y mínimo alcanzado y con una tendencia a disminuir con la edad (Figura 1).

Discusión

La influencia de la raza sobre la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002), tal y como hemos comentado anteriormente. Esto ha llevado a clasificar a los animales como *tolerantes* y/o *resistentes* y a realizar una selección racial específica para adaptarse a las necesidades de cada región geográfica, permitiendo en muchos casos disminuir la incidencia de patologías asociadas tanto a la deficiencia de cobre (como la ataxia enzoótica o los problemas reproductivos), como al exceso de acumulación hepática de cobre. Estas diferencias genéticas en el metabolismo de cobre en ganado ovino parecen estar asociadas en

parte a diferencias en la absorción intestinal del cobre dietético (Wiener et al., 1978; Woollians et al., 1983) aunque también pueden producirse por diferencias debidas al metabolismo, fundamentalmente hepático, y distribución del cobre absorbido (Woollians et al., 1982, 1983). La existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas de cobre ha quedado demostrada con el éxito de la selección de líneas genéticas con niveles de cobre altos y bajos dentro incluso de una misma raza, donde la herencia genética puede explicar un 0,3 % de la variación normal de este parámetro (Radostits et al., 2002).

En ganado vacuno, por el contrario, apenas se ha estudiado el efecto de la raza sobre el metabolismo de cobre a nivel sanguíneo. Si bien se ha constatado como al recibir la misma ración *ad libitum* rica en cobre el ganado Jersey presenta una mayor cantidad de cobre plasmático que el Holstein, además de una mayor actividad de la ceruloplasmina (Du et al., 1996), se desconoce lo que sucede en la mayor parte de las razas de vacuno.

El contenido de cobre en sangre total se divide en dos grupos: el cobre presente en los glóbulos rojos (fundamentalmente formando parte de la enzima superóxido dismutasa) y el cobre presente en plasma. A su vez, en el suero o plasma el cobre está distribuido dentro de tres grandes compartimentos constituyendo dos *pools* entre los cuales no parece ocurrir intercambio: la ceruloplasmina (que supone el principal componente) que representa el cobre exportado del hígado hacia los tejidos, y el cobre unido a la albúmina y a ciertos aminoácidos que representa principalmente el cobre transportado desde el intestino hacia el hígado a través de la circulación portal (Cousins, 1985).

Debido a que la síntesis de ceruloplasmina ocurre en el hígado, podría esperarse que los niveles de actividad de esta cuproenzima en el suero fuesen un indicador apropiado del grado de acumulación del metal en el hígado, sin embargo, resultados de investigaciones previas (Blackley y Hamilton, 1985; Stoszed et al., 1986; López-Alonso et al., 2006) ponen de manifiesto que ambos parámetros no están correlacionados de forma significativa, tanto a niveles normales como elevados de acumulación de cobre en el hígado. Esto es debido a que, una vez que el animal alcanza un estatus adecuado de cobre en el hígado, la ceruloplasmina (al igual que otras cuproenzimas como la superóxido dismutasa de los eritrocitos) expresa una actividad máxima que no se incrementa a pesar de la acumulación de elevadas concentraciones de cobre en el hígado (Baker et al., 1999; Rock et al., 2000).

En cuanto a la concentración de cobre en sangre entera, a pesar de no haber sido en los últimos años uno de los principales parámetros para evaluar el estatus de cobre en rumiantes (Suttle, 1993), podría ser un indicador de la acumulación de cobre en el hígado en estas especies animales. De hecho, en un estudio reciente en el que se investigaban nuevos marcadores de sobre-exposición a este metal en la especie

humana se ha demostrado que el cobre es capaz de fijarse con gran afinidad a ciertas proteínas presentes en la superficie de los eritrocitos (Speisky et al., 2003). No obstante, es todavía necesario estudiar en detalle y caracterizar estas proteínas eritrocitarias para poder validar su empleo como marcadores de exposición a elevados niveles de cobre.

Los resultados de nuestro estudio indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos considerados, que nos permitan establecer un componente racial en los niveles de cobre en sangre en terneros. Sin embargo, y dentro de la variabilidad descrita, consideramos que merece especial mención el hecho de que los terneros de raza Frisona sean los que muestren en la mayor parte de los muestreos las menores concentraciones de cobre, tanto en sangre como en suero, como de actividad ceruloplasmina. Teniendo en cuenta la información que aporta cada uno de estos parámetros, como mencionamos anteriormente, los resultados de nuestro estudio podrían indicar que la mayor acumulación de cobre en hígado descrita en el ganado de raza Frisona no sería debida a una mayor absorción intestinal de cobre a través de la dieta, porque de ser así, tanto los niveles de cobre en suero como en sangre tendrían que ser más elevados al compararlos con el resto de los grupos. Por el contrario, los terneros de raza Rubia gallega son los que presentan en general las mayores concentraciones de cobre en suero y ceruloplasmina. Según la información que aportan estos parámetros podríamos pensar, entonces, que las diferencias observadas en nuestro estudio se podrían deber a una mayor movilización de cobre desde el hígado hacia los tejidos—aspecto que se evaluará en detalle en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral—donde entraría en escena la ceruloplasmina que representa el cobre funcional que es exportado del hígado hacia los tejidos (80-90% del cobre en suero). Asimismo, la mayor parte del cobre en sangre entera se encuentra en suero (80-90%), y solamente cuando se alcanzan niveles tóxicos o muy elevados es cuando este metal se une a la superficie de los eritrocitos (Speisky et al., 2003) o queda libre en el torrente sanguíneo provocando una crisis hemolítica (Suttle, 2003).

Otro punto que merece especial mención es que los terneros cruces de ambas razas presentan en general una evolución diferente a sus razas puras a lo largo del período experimental considerado. Para los niveles de cobre en suero, por ejemplo, ocupan una posición intermedia entre los de raza Rubia gallega y los Frisones. Sin embargo, tanto para la concentración de cobre en sangre entera como para la concentración de ceruloplasmina en suero, muestran una evolución diferente a las otras dos razas, aumentando dichos parámetros cuando en las razas puras disminuyen y viceversa. Estos resultados son complejos de interpretar con la información de la que disponemos, si bien al ocupar estos animales una frecuente posición intermedia entre ambas razas, y al tratarse en general de un grupo más heterogéneo de

animales, podrían deberse a variaciones fisiológicas dentro de su crecimiento. No obstante, también es posible que estas diferencias sean simplemente debidas al azar.

A pesar de las diferencias en el comportamiento de los parámetros sanguíneos de cobre encontradas entre las tres razas, observamos que en general todos los terneros tienden a disminuir la concentración de cobre en suero, sangre y ceruloplasmina a medida que aumenta su edad. Estos resultados coinciden con lo descrito por Underwood y Suttle (2002), que señalan un aumento en la concentración hepática de cobre en la mayoría de las especies de mamíferos durante el periodo intrauterino, llegando a un máximo antes o en el momento del nacimiento y después una disminución paulatina hasta alcanzar los niveles encontrados en adultos.

Al estudiar la evolución a lo largo del ciclo productivo de los parámetros sanguíneos de cobre considerados observamos que su comportamiento es diferente. Así, mientras que los niveles de cobre en suero sufren un descenso acusado a los 3 meses de vida de los terneros, la concentración de cobre en sangre entera disminuye de forma significativa a los 5 meses de edad. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que el cobre contenido en los eritrocitos lo está en su mayoría formando parte del enzima superóxido dismutasa, a la que se incorpora durante la eritropoyesis. En un estudio realizado por Suttle y McMurray (1983) se observó que en animales con depleción de cobre, la disminución en la actividad de esta enzima se evidenciaba con posterioridad a la disminución de cobre en plasma; dicha demora varió desde 0 a 80 días en terneros, siendo especialmente evidente en corderos jóvenes en crecimiento sujetos a una severa depleción de cobre. Se observó además que la concentración de cobre en plasma decreció de forma exponencial con el tiempo mientras que la actividad superóxido dismutasa lo hizo linealmente: 6 días después de comenzar la hipocupremia, el cobre en plasma había caído un 67%, mientras que la actividad superóxido dismutasa lo había hecho en un 25%. Por otra parte, la repleción de la actividad superóxido dismutasa no solo comenzó más tarde sino que continuó de forma más lenta en el tiempo, sobre todo en animales en crecimiento. Así, la concentración normal de cobre en plasma se alcanzó dentro de los 15 días, sin embargo, la actividad superóxido dismutasa fue de solo el 59% con respecto al valor inicial después de pasados 35 días y continuó incrementándose hasta el día 70 (Suttle and McMurray, 1983). Estos autores señalan que las diferencias en el lapso de tiempo entre los picos de cobre en suero y actividad superóxido dismutasa podría ser el resultado de diversos factores, entre los que destaca la larga vida media y el rango de crecimiento de la población de eritrocitos (aproximadamente 150 días) junto con la incorporación de cobre dentro de la superóxido dismutasa durante la eritropoyesis. Además, pueden observarse cambios en la actividad superóxido dismutasa, y por tanto del cobre contenido en los eritrocitos, independientemente del contenido de cobre en la dieta. Así, Paynter y

Caple (1984) describen incrementos en la actividad enzimática en relación con la edad en corderos, los cuales parecen estar relacionados a verdaderos efectos del desarrollo.

Al igual que sucede con la superóxido dismutasa, la actividad ceruloplasmina en suero sufre variaciones a lo largo de la vida del animal, independientemente del estatus de cobre del mismo. Esto es debido, como comentamos anteriormente, a que una vez que el animal alcanza un estatus adecuado de cobre en el hígado, la ceruloplasmina expresa una actividad máxima, que no se incrementa a pesar de que el animal reciba suplementación mineral (Baker et al., 1999; Rocke et al., 2000). Por el contrario, la actividad sérica de la ceruloplasmina puede variar en relación a otros factores como el sexo o la edad de los animales (Fisher et al., 1990; Milne, 1994) y aumentar de forma importante en respuesta a otros factores distintos a los niveles de cobre en la dieta, como por ejemplo el ejercicio intenso, la inflamación o diversos procesos infecciosos (Harris, 1997; Beshetoor y Hambridge, 1998).

Tabla 1. Concentraciones de cobre en suero (mg/l) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas a lo largo del ciclo productivo.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
N	9	9	11	11	10	11	8
Media	0,751	0,691	0,598	0,595	0,616	0,723	0,748
ES	0,072	0,055	0,071	0,046	0,042	0,046	0,072
MG	0,725	0,674	0,555	0,577	0,604	0,711	0,724
Mínimo	0,501	0,492	0,263	0,348	0,468	0,553	0,508
Máximo	1,137	0,911	1,057	0,855	0,910	1,108	1,091
Frisona							
N	9	9	9	4	8	9	7
Media	0,716	0,572	0,561	0,528	0,584	0,650	0,588
ES	0,097	0,087	0,071	0,065	0,054	0,045	0,045
MG	0,655	0,524	0,518	0,516	0,568	0,637	0,578
Mínimo	0,236	0,238	0,224	0,393	0,445	0,445	0,455
Máximo	1,184	1,055	0,851	0,686	0,884	0,885	0,768
Cruces							
N	8	10	10	9	10	10	9
Media	0,849	0,632	0,621	0,592	0,587	0,659	0,616
ES	0,056	0,103	0,070	0,059	0,046	0,062	0,081
MG	0,835	0,569	0,589	0,568	0,571	0,636	0,577
Mínimo	0,663	0,246	0,363	0,336	0,420	0,409	0,303
Máximo	1,014	1,390	1,085	0,928	0,869	1,111	1,122

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 2. Concentraciones de cobre en sangre (mg/l) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas a lo largo del ciclo productivo.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
N	9	11	11	11	11	11	8
Media	0,990	0,916	0,969	0,845	0,842	0,772	0,777
ES	0,027	0,034	0,039	0,023	0,023	0,038	0,054
MG	0,987	0,909	0,962	0,842	0,839	0,763	0,764
Mínimo	0,860	0,706	0,830	0,711	0,767	0,609	0,613
Máximo	1,104	1,082	1,298	0,938	1,048	1,061	1,012
Frisona							
N	8	10	9	9	9	9	9
Media	0,986	0,878	0,945	0,783	0,833	0,800	0,729
ES	0,045	0,023	0,031	0,049	0,041	0,037	0,020
MG	0,979	0,875	0,941	0,773	0,825	0,794	0,727
Mínimo	0,821	0,775	0,845	0,631	0,698	0,680	0,627
Máximo	1,138	1,021	1,126	1,145	1,021	1,039	0,828
Cruces							
N	10	10	10	9	10	10	9
Media	1,011	1,023	0,903	0,837	0,735	0,819	0,816
ES	0,041	0,050	0,045	0,060	0,047	0,064	0,062
MG	1,004	1,012	0,893	0,824	0,723	0,799	0,800
Mínimo	0,865	0,784	0,749	0,688	0,569	0,587	0,619
Máximo	1,205	1,305	1,221	1,285	1,021	1,291	1,251

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 3. Concentraciones de ceruloplasmina en suero (mg/l) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas a lo largo del ciclo productivo.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
N	11	11	10	11	8	9	7
Media	0,245	0,219	0,256	0,232	0,260	0,232	0,216
ES	0,017	0,015	0,021	0,015	0,026	0,016	0,025
MG	0,239	0,214	0,248	0,226	0,249	0,227	0,207
Mínimo	0,15	0,14	0,16	0,16	0,14	0,13	0,13
Máximo	0,36	0,33	0,39	0,3	0,36	0,29	0,3
Frisona							
N	9	10	8	6	9	9	9
Media	0,226	0,210	0,234	0,217	0,233	0,211	0,198
ES	0,025	0,022	0,040	0,034	0,025	0,019	0,024
MG	0,214	0,199	0,212	0,202	0,222	0,204	0,186
Mínimo	0,14	0,12	0,12	0,11	0,12	0,14	0,11
Máximo	0,34	0,3	0,44	0,34	0,34	0,29	0,35
Cruces							
N	8	9	9	10	10	10	9
Media	0,226	0,253	0,201	0,240	0,185	0,190	0,207
ES	0,026	0,017	0,019	0,023	0,016	0,014	0,040
MG	0,216	0,249	0,195	0,230	0,179	0,185	0,182
Mínimo	0,140	0,160	0,140	0,150	0,130	0,110	0,100
Máximo	0,360	0,330	0,320	0,350	0,280	0,250	0,460

ES: error estándar; MG: media geométrica

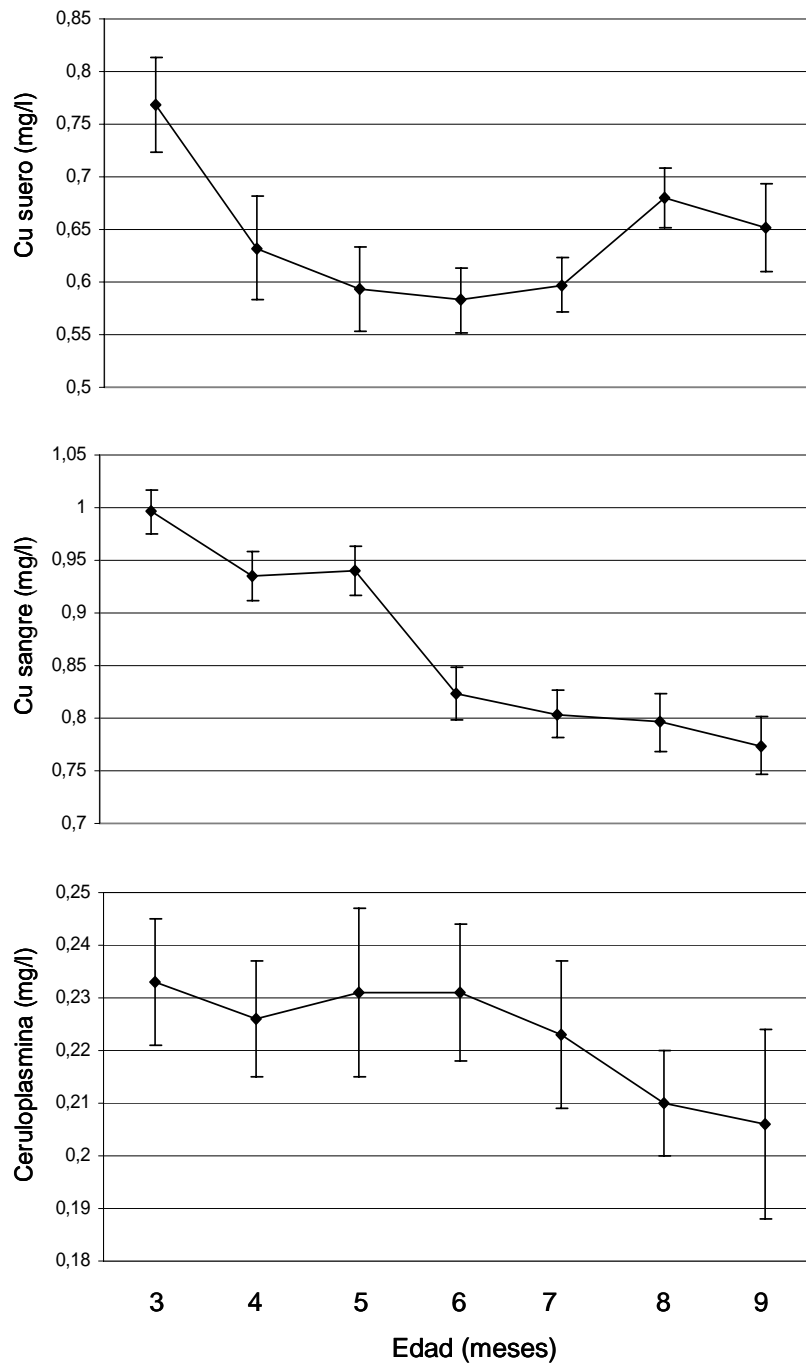


Figura 1. Evolución de los niveles de cobre en suero y sangre entera (mg/l) y actividad ceruloplasmina en suero (mg/l), expresados como media aritmética \pm error standard en los terneros de este estudio a lo largo del ciclo productivo.

Capítulo II

Evaluación de los niveles de cobre en tejidos post mórtem

Diversos autores han descrito diferencias raciales en la acumulación de cobre a nivel hepático en ganado ovino (Woolliams et al. 1982; Van der Berg et al., 1983). Se observó, por ejemplo, que la raza North Ronaldsay es muy sensible al cobre ambiental sufriendo daños hepatocelulares con exuberante fibrosis e incipiente cirrosis, mientras que la raza Cambridge es mucho más tolerante (Simpson et al., 2004) y acumula cobre de una forma más lenta, sufriendo un cambio patológico en el hígado más leve. Estas respuestas podrían derivar de una diferente expresión de los componentes celulares constituyentes del hígado que a su vez estaría determinada por factores genéticos. Aunque en un primer momento se asumió que las diferencias en el estatus de cobre entre razas se debían principalmente a las diferencias entre el metal consumido y el absorbido, más adelante se constató que los patrones de excreción de cobre y redistribución orgánica parecían explicar mejor las diferencias a partir de la retención hepática del cobre absorbido. Los distintos rangos de excreción demostraron diferencias en la capacidad del hígado para adaptarse a altas concentraciones de cobre, observándose, por ejemplo, que cuando el aporte de cobre es insuficiente, las razas caracterizadas por una pobre retención hepática desarrollan hipocuprosis, como es el caso de la raza escocesa Blackface (Woolliams et al., 1986).

En ganado vacuno, sin embargo, la importancia del componente racial en el metabolismo hepático del cobre apenas se ha estudiado. Aunque se sabe que razas como la Simmental o la Charolesa presentan mayores necesidades que otras como la Aberdeen angus (Radostitis et al., 2002), poco se conoce sobre el metabolismo hepático del cobre y la distribución orgánica del mismo en éstas y otras razas de ganado vacuno.

El objetivo de este capítulo es determinar el grado de acumulación orgánica de cobre en las distintas razas utilizadas en nuestro estudio, sometidas al nivel de suplementación máximo que permite la legislación europea (35 mg de cobre/kg MS).

Material y Métodos

Muestras

Para este estudio se seleccionaron muestras de hígado, riñón, cerebro, corazón, bazo y músculo (pectoral, diafragma y semitendinoso) recogidas tras el sacrificio de los animales (n=29). Una vez en el laboratorio, las muestras se limpiaron de grasa, tejido conectivo y vasos sanguíneos, y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis laboratorial.

Métodos

Las muestras se sometieron a una digestión ácida en un sistema de microondas. Las concentraciones de cobre fueron determinadas mediante Espectroscopía de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES).

Los detalles de los métodos analíticos empleados, así como el control de calidad analítica empleado durante el experimento, aparecen descritos en detalle en el apartado de material y métodos.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa SPSS para Windows (v.14.0). La normalidad de los datos se comprobó empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La influencia de la raza sobre la acumulación de cobre en los distintos tejidos analizados se estudió mediante un análisis de varianza de una vía.

Resultados

Los resultados de las concentraciones de cobre por unidad de peso (expresados como mg/kg peso fresco) en los distintos órganos y tejidos analizados en este estudio en las razas Rubia gallega, Frisona y los cruces de ambas aparecen reflejados en la Tabla 1.

El hígado es el órgano que presenta la mayor capacidad de acumulación, con una concentración de cobre entre 40 y 300 veces superior al resto de tejidos analizados. En cuanto a las diferencias entre razas observamos que la raza Frisona (174 mg/kg peso seco) presenta una concentración de cobre en hígado un 24% superior a la Rubia gallega (140 mg/kg) y un 5% superior a los cruces de ambas razas (166 mg/kg), si bien estas diferencias no alcanzaron significación estadística ($p > 0,05$). La raza Frisona es, además, la que presenta un mayor porcentaje de animales (89%) con niveles hepáticos de cobre asociados con toxicidad en ganado vacuno (>150 mg/kg peso fresco; Perrin et al., 1990; Gummow, 1996), frente al 70% en los cruces industriales y al 40% en los terneros de raza Rubia Gallega.

En el resto de los órganos analizados, a excepción del cerebro, se observa que los terneros de raza Rubia gallega presentan concentraciones de cobre superiores a los

de raza Frisona, ocupando los cruces industriales una posición intermedia entre ambas razas. En el bazo los terneros de raza Rubia gallega (0,903 mg/kg) superan a los cruces (0,855 mg/kg) y Frisones (0,817 mg/Kg) en un 5 y 10%, respectivamente. En el corazón encontramos una diferencia del 1 y 7% entre los terneros de raza Rubia gallega (3,62 mg/kg) y los cruces (3,59 mg/kg) y Frisones (3,37 mg/kg) respectivamente. A nivel renal los terneros de raza Rubia gallega presentan una concentración de cobre (4,03 mg/kg) un 12 y 5 % superior a los Frisones (3,59 mg/kg) y cruces de ambas razas (3,82 mg/kg) respectivamente. En cerebro observamos, sin embargo, que los cruces presentan los valores más elevados (3,32 mg/kg), muy similares a los Frisones (3,29 mg/kg) con tan solo un 1% de diferencia y seguidos por los de raza Rubia gallega (2,66 mg/kg) con un 20% menos de concentración de cobre. No obstante, en ningún caso las diferencias entre razas encontradas alcanzan significación estadística ($p > 0,05$).

En cuanto a los niveles de cobre en los distintos músculos analizados, observamos que para el músculo pectoral la raza Frisona (0,790 mg/kg) presenta una concentración de cobre significativamente superior ($F_{2,28} = 3,650$, $p < 0,05$) a la Rubia gallega (0,541 mg/kg), mostrando los cruces una posición intermedia entre ambas razas (0,631 mg/kg). El mismo patrón de distribución fue observado para el músculo semitendinoso, con unas concentraciones medias de cobre de 0,577, 0,552 y 0,507 mg/kg para los terneros de raza Frisona, cruces y Rubia gallega respectivamente, aunque sin alcanzar estas diferencias relevancia estadística. Finalmente señalar que las concentraciones de cobre a nivel de diafragma fueron entre 2 y 3 veces superiores al resto de músculos analizados, aunque muy similares en las tres razas estudiadas (1,55-1,67 mg/kg).

Cuando se analizan las concentraciones de cobre totales (expresados como mg) en los distintos órganos analizados en este estudio (Tabla 2) observamos que los terneros de raza Frisona (1,070 mg) siguen siendo los que presentan una mayor acumulación total de cobre a nivel hepático ($F_{2,28} = 3,695$, $p < 0,05$), seguidos de los cruces (868 mg) y los de raza Rubia gallega (663 mg), lo que supone un 23 y 61% de mayor capacidad de acumulación, respectivamente. En el resto de órganos, al contrario de lo que sucedía al analizar la concentración de cobre por unidad de peso, observamos que el contenido total de cobre en los terneros de raza Frisona es superior a la raza Rubia gallega y, a excepción del bazo, los cruces presentan una posición intermedia entre ambas razas, si bien en ningún caso las diferencias alcanzan significación estadística. A nivel renal los terneros de raza Frisona presentan un acúmulo total de cobre (3,89 mg) un 21 y 10 % significativamente superior a los de Rubia gallega (3,21 mg) y cruces de ambas razas (3,54 mg). En el corazón encontramos una diferencia del 11 y 6% entre los terneros de raza Frisona (5,67 mg) , los cruces (5,33 mg) y la raza Rubia gallega (5,10 mg), respectivamente. Finalmente, a nivel del bazo los terneros de raza

Frisona (0,647 mg) superan a los cruces (0,563 mg) y Rubia gallega (0,641 mg) en un 15 y 1%, respectivamente.

Discusión

Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que con los niveles de suplementación de cobre que permite la legislación europea (35 mg/kg MS) se alcanzan niveles de residuo muy elevados a nivel hepático, y a excepción de un ternero de raza Frisona todos los demás animales presentan concentraciones por encima de los niveles fisiológicos (25-100 mg/kg peso fresco; Puls, 1994); incluso la mayoría de los terneros de raza Frisona, y el 40% de los de Rubia gallega se sitúan por encima de 150 mg/kg peso fresco, concentración con la que se han observado episodios de toxicidad en ganado vacuno (Perrin et al., 1990; Gummow, 1996). A diferencia de lo que ocurre en el hígado, las concentraciones de cobre en el resto de los tejidos analizados son muy bajas en los tres grupos raciales considerados, y se sitúan en todos los casos dentro de los valores fisiológicos descritos por Puls (1994). Estos resultados ponen de manifiesto que el hígado es el principal órgano de acumulación de cobre a nivel orgánico.

En el ganado bovino, a diferencia de lo que ocurre en ovino, la influencia racial en la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido poco estudiada. Si bien es conocido el hecho de que ciertas razas como la Simmental y la Charolesa tienen mayores requerimientos de cobre que otras como la Aberdeen Angus (Radostits et al., 2002; Underwood y Suttle, 2002; Mullis et al., 2003), la información de la que se dispone se limita a un número limitado de razas. A la hora de explicar las diferencias raciales en el metabolismo de cobre en ganado vacuno, y por tanto las necesidades de cobre en dichos animales, se ha propuesto que pueden deberse, al igual que en ganado ovino, tanto a diferencias en la absorción de cobre a nivel intestinal, como a nivel del metabolismo hepático y/o a la redistribución tisular del cobre absorbido.

Littledike et al. (1995) en un estudio de suplementación con cobre a largo plazo obtuvieron concentraciones hepáticas más elevadas en Limousin al compararla con otras ocho razas bovinas, entre las que se encontraban la Aberdeen Angus, Hereford, Simmental y Charolesa, y sugirieron que podría ser debido a una mayor absorción de cobre en esta raza, aunque esta diferencia también podría ser explicada por el tamaño pequeño del hígado y los altos niveles hepáticos de zinc en esta raza.

Du et al. (1996) observaron como al recibir la misma ración *ad libitum* rica en cobre, el ganado Jersey acumulaba más cobre en hígado que el Holstein, aunque también es cierto que consumían más alimento por unidad de peso metabólico. Se encontraron además diferencias en la actividad de la ceruloplasmina, principal enzima exportadora de cobre hacia los tejidos. Este estudio fue la primera demostración de

las diferencias genéticas en la concentración del cobre hepático dentro del vacuno de leche, atribuidas a diferencias en la absorción de cobre dietético, excreción de cobre endógeno y la cantidad de comida ingerida.

Varias investigaciones (Woolliams et al., 1983; Gooneratne et al., 1994) sugieren, además, que las diferencias en la excreción del cobre endógeno también contribuyen a explicar las diferencias genéticas en la retención de cobre hepático. La elevada excreción biliar causa una deficiencia de cobre con más frecuencia en Simmental que en otras razas bovinas; así en un estudio realizado por Gooneratne et al. (1994) empleando distintos tipos de dietas (con niveles altos y bajos de cobre, con o sin suplementación de molibdeno y azufre) se constató que la excreción biliar de la raza Simmental fue al menos dos veces la de la Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta.

En nuestro estudio encontramos, al igual que en investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación en condiciones de campo (Cruz, 2005; Miranda et al., 2006) que los terneros de raza Frisona acumulan concentraciones superiores de cobre en hígado que los de raza Rubia gallega, siendo la diferencia especialmente notable (61%) cuando se considera la capacidad de almacenamiento total en este órgano. El hecho de que los cruces industriales mantengan una posición intermedia entre ambas razas apunta a que estas diferencias tengan un componente genético importante.

Las diferencias en la acumulación de cobre a nivel hepático en los terneros de nuestro estudio podrían explicarse en parte, al igual que en el estudio llevado a cabo por Du et al (1996) en las razas Jersey y Holstein, teniendo en cuenta el mayor consumo de alimento de los terneros Frisones, en comparación con los de raza Rubia gallega (17% inferior) y los cruces de ambas razas (9% inferior). Sin embargo, a diferencia de ese estudio, en nuestro caso los terneros de raza Frisona son los que presentan una menor concentración de cobre sanguíneo, tanto en sangre entera como en suero, tal y como se ha descrito en el capítulo 1, lo que en principio no parece avalar la hipótesis de una mayor absorción intestinal.

El tamaño relativo del hígado tampoco parece explicar las diferencias observadas entre los grupos de nuestro estudio, tal y como apuntan en sus investigaciones Littledike et al. (1995). Si bien es cierto que existen diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del hígado entre los grupos de terneros considerados en este estudio, son los terneros Frisones los que presentan un mayor peso medio ($5,98 \pm 0,32$ Kg) en comparación con los de raza Rubia gallega ($4,70 \pm 0,18$ Kg) y los cruces de ambas razas ($5,19 \pm 0,12$), y por tanto la capacidad de acumulación de cobre a nivel hepático es incluso superior cuando se consideran los valores para el conjunto del órgano como ya se ha comentado. Littledike et al. (1995) también señalan como posible causa de un mayor acúmulo de cobre a nivel hepático de la raza Limousin

unos altos niveles de zinc en el hígado. En nuestro estudio, los niveles de zinc (datos no mostrados) son muy similares en los tres grupos de animales (Frisones: $41,1 \pm 4,36$; Rubia gallega: $38,9 \pm 1,21$; Cruces: $44,2 \pm 4,36$ mg/kg peso fresco) no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($F_{2,28} = 0,800$, $p = 0,460$), por lo que es poco probable que el estatus de este oligoelemento tenga una influencia importante en la acumulación de cobre a nivel hepático.

Las diferencias en la acumulación de cobre en el hígado en los animales de nuestro estudio podrían deberse a diferencias en el metabolismo hepático y/o a la redistribución tisular del cobre absorbido. Una vez que el cobre es absorbido en el intestino entra en el hígado a través de la circulación portal donde puede ser utilizado en el metabolismo normal—formando parte de varias cuproenzimas o incorporado a la ceruloplasmina para ser exportado hacia los tejidos—almacenado ligado a metalotioneínas o, si el balance es positivo, excretado hacia la bilis. Las metalotioneínas parecen jugar un papel esencial en la excreción de cobre hacia la bilis, bien por una vía directa a través del citoplasma del hepatocito o bien, de forma más importante, a través de la vía hepatolisosomal en la cual el cobre unido a metalotioneínas es secuestrado por los lisosomas para ser excretado a través de la bilis.

En este trabajo de investigación no hemos llevado a cabo estudios de excreción biliar que nos permitan determinar si las diferencias de acumulación de cobre en el hígado entre los terneros de raza Frisona y Rubia gallega se deban a una diferencia de excreción del cobre endógeno, tal y como describieron Woolliams et al. (1983) y Gooneratne et al. (1994) en sus investigaciones con ganado Simmental y Aberdeen Angus. No obstante, está bien establecido que en las marcadas diferencias entre especies a padecer procesos de toxicidad por cobre juega un papel muy importante la capacidad de inducción de síntesis de metalotioneínas, la que a su vez determina un patrón característico de distribución a nivel subhepático y capacidad de excreción biliar, aspectos que se tratarán en detalle en el capítulo IV de la presente Tesis Doctoral.

No obstante, nuestros resultados apuntan a que las diferencias en la acumulación de cobre a nivel hepático puedan deberse, al menos en parte, a una distinta capacidad de redistribución del cobre hepático hacia los tejidos, fundamentalmente en forma de ceruloplasmina. Tal y como se analizó en el capítulo I, los terneros de raza Rubia gallega presentan en general una mayor actividad de ceruloplasmina en suero que los de raza Frisona, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Estos resultados, junto con una mayor concentración de cobre en todos los tejidos analizados (a excepción del cerebro) en esta raza podrían indicar una mayor movilización de cobre desde el hígado hacia los tejidos o captación de cobre por parte de los mismos. El hecho de que los cruces industriales muestren en general una

posición intermedia entre ambas razas apoya la hipótesis de un componente genético en este comportamiento.

Tabla 1. Niveles de cobre (expresados como mg/kg peso fresco) en terneros de razas Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de ambas en los distintos órganos y tejidos analizados en este estudio.

	hígado	riñón	bazo	corazón	cerebro	músculos			
						pectoral	diafragma	semitendinoso	
Rubia gallega									
	Media	140	4,03	0,903	3,62	2,66	0,507	1,67	0,541
	ES	9	0,16	0,043	0,09	0,13	0,026	0,06	0,035
	MG	137	4,00	0,896	3,61	2,64	0,502	1,66	0,530
	Mínimo	103	3,34	0,795	3,21	2,24	0,413	1,40	0,375
	Máximo	197	4,70	1,236	3,88	3,38	0,684	1,98	0,687
Frisona									
	Media	174	3,59	0,817	3,37	3,29	0,577	1,66	0,790
	ES	17	0,21	0,036	0,09	0,36	0,026	0,05	0,076
	MG	165	3,54	0,811	3,36	3,14	0,573	1,66	0,766
	Mínimo	79	2,24	0,682	3,00	1,93	0,505	1,44	0,585
	Máximo	253	4,22	1,027	3,79	5,56	0,749	1,94	1,288
Cruces									
	Media	166	3,82	0,855	3,59	3,32	0,552	1,55	0,631
	ES	15	0,11	0,026	0,09	0,19	0,027	0,04	0,078
	MG	160	3,81	0,852	3,58	3,27	0,546	1,55	0,593
	Mínimo	102	3,26	0,766	3,17	2,52	0,431	1,38	0,361
	Máximo	252	4,36	1,051	4,08	4,17	0,676	1,86	1,154
Total									
	Media	159	3,83	0,858	3,53	3,11	0,544	1,63	0,649
	ES	8	0,10	0,021	0,05	0,15	0,015	0,03	0,041
	MG	153	3,79	0,852	3,52	3,03	0,538	1,62	0,618
	Mínimo	79	2,24	0,682	3,00	1,93	0,413	1,38	0,361
	Máximo	253	4,70	1,236	4,08	5,56	0,749	1,98	1,288

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 2. Concentraciones de cobre totales (expresados como mg) en terneros de razas Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de ambas en los distintos órganos y tejidos analizados en este estudio

		hígado	riñón	bazo	corazón
Rubia gallega					
	N	10	10	9	9
	Media	663	3,21	0,641	5,10
	ES	59	0,23	0,044	0,21
	MG	641	3,13	0,629	5,07
	Mínimo	429	2,17	0,436	3,97
	Máximo	1022	4,70	0,865	5,80
Frisona					
	N	9	8	9	9
	Media	1070	3,89	0,647	5,67
	ES	150	0,23	0,054	0,23
	MG	978	3,84	0,627	5,63
	Mínimo	409	2,69	0,341	4,59
	Máximo	1960	4,73	0,924	6,75
Cruces					
	N	10	10	10	10
	Media	868	3,54	0,563	5,33
	ES	87	0,11	0,033	0,19
	MG	829	3,52	0,556	5,30
	Mínimo	500	2,97	0,478	4,57
	Máximo	1359	3,98	0,832	6,23
Total					
	N	29	28	28	28
	Media	860	3,52	0,615	5,37
	ES	65	0,12	0,025	0,12
	MG	799	3,46	0,601	5,33
	Mínimo	409	2,17	0,341	3,97
	Máximo	1960	4,73	0,924	6,75

ES: error estándar; MG: media geométrica

Capítulo III

Distribución de cobre en hígado en función de la región anatómica

Diversos estudios experimentales ponen de manifiesto que ciertos metales tóxicos no se acumulan de forma homogénea a nivel de un órgano o víscera. En este sentido, está bien establecido que la acumulación de cadmio a nivel renal ocurre en una proporción superior a nivel de la corteza que de la médula (Olsson y Oskarsson, 2000), lo que hace que sea imprescindible la homogeneización previa de dicho órgano antes de la cuantificación de los niveles de cadmio con el objetivo de que la muestra analizada sea representativa de todo el órgano, y por tanto, para que los resultados entre distintos estudios sean comparables. Es posible además que otros factores, como puede ser la raza del individuo determinen pequeñas variaciones anatómicas que puedan condicionar la acumulación orgánica de un elemento.

La cantidad de tejido analizado también puede suponer una fuente de variación importante cuando se cuantifican los niveles orgánicos de un determinado elemento, especialmente cuando las muestras son muy pequeñas—como por ejemplo aquellas obtenidas mediante biopsias in vivo—y hay restos de sangre o tejido conectivo en proporciones más elevadas que en el resto de la víscera.

En cuanto al cobre, está bien descrito a nivel experimental en ganado ovino que su acumulación a nivel hepático no ocurre de forma uniforme en todo el órgano. En un estudio descrito por Kumaratilake y Howell (1986) se evidenció que las primeras células que presentaban gránulos de cobre eran las de Kupffer adyacentes a la vena central, luego las células de Kupffer, macrófagos y hepatocitos de la tríada portal. El número y tamaño de los gránulos difería entre los hepatocitos de distintas zonas, así, a bajas concentraciones de cobre hepático, la mayor intensidad de gránulos se encontraban en los hepatocitos de la zona centrolobulillar, particularmente adyacentes a la vena central. A medida que se incrementa la concentración de cobre, el número de hepatocitos con gránulos así como el tamaño de los mismos aumenta y se extiende a través de la zona media del lobulillo hacia la tríada portal. Finalmente, en biopsias con contenidos muy altos de cobre, aparecen hepatocitos con gránulos en las tres zonas de los lobulillos, pero la mayoría en la zona centrolobulillar y mediolobulillar, contrariamente a lo que sucede con las células de Kupffer y macrófagos, que aparecen mayormente teñidos los de la zona periportal.

Los objetivos que nos planteamos en este capítulo son evaluar si existen diferencias de acumulación de cobre a nivel hepático entre las distintas regiones anatómicas en las razas consideradas en este estudio, así como comprobar la validez de la biopsia hepática in vivo para determinar la acumulación intrahepática de cobre.

Material y métodos

Muestras

Para la determinación de la concentración de cobre en las distintas áreas del hígado se consideraron las regiones anatómicas descritas por Popesco (1998) y Sisson y Grossman (2005) para el ganado vacuno (Figura 4, material y métodos).

El hígado de los rumiantes asienta casi en su totalidad en el lado derecho del plano medio, con el lóbulo derecho localizado dorsalmente y el izquierdo ventralmente, desplazamiento causado por el gran desarrollo del rúmen en el lado izquierdo de la cavidad abdominal. La superficie diafragmática está, en su mayor parte, moldeada al hueco de la mitad derecha del diafragma, aunque una pequeña parte está en contacto con las dos o tres últimas costillas y algunas veces con el costado en el ángulo lumbocostal. La superficie visceral es cóncava. Su característica más importante es la *porta hepatis*, una depresión limitada por la apófisis papilar, el lóbulo caudado y la zona de unión del páncreas y por la que entran la vena porta y la arteria hepática y el conducto hepático común abandona el hígado. Las lobulaciones del hígado de los rumiantes se distinguen mejor en la oveja y la cabra que en vacuno. Existe una línea desde la escotadura del ligamento redondo a la impresión esofágica, sobre la superficie visceral y otra línea de inserción del ligamento falciforme en la superficie diafragmática, que marca la división entre el lóbulo izquierdo (ventral en los rumiantes) y los lóbulos caudado y cuadrado. El lóbulo caudado está ubicado entre la vena cava y la rama izquierda de la vena porta y el lóbulo cuadrado está situado entre la rama izquierda y el borde ventral del hígado. El lóbulo caudado tiene dos prolongaciones: la más pequeña, la apófisis papilar, que se proyecta dentro del vestíbulo de la bolsa omental y se solapa con la rama izquierda de la vena porta; la mayor, el proceso caudal elongado, que se extiende a la derecha, cubre gran parte de la superficie visceral del lóbulo derecho y parte de la impresión renal. El lóbulo derecho está limitado por una línea desde la fosa de la vesícula biliar, a través de la porta, hasta el surco de la vena cava. Este es más corto y grueso.

La toma de muestras se llevó a cabo a nivel del matadero inmediatamente después del sacrificio de los animales. Una vez separado de la canal el hígado fue pesado y se tomaron muestras de aproximadamente 7x5 cm de todos los lóbulos (lóbulos derecho externo, derecho interno, izquierdo, caudado, cuadrado y apófisis papilar) como se describe en el apartado de material y métodos general.

Las biopsias *in vivo* se recogieron siguiendo el procedimiento descrito por Udall et. Al., (1952) y Larson et al. (1995), previo al sacrificio de los animales (la técnica se haya descrita en el apartado de material y métodos).

Métodos

La preparación de las muestras de los distintos lóbulos hepáticos para la cuantificación de los niveles de cobre se llevó a cabo mediante una digestión ácida en un sistema de microondas. En el caso de las muestras obtenidas por biopsia *in vivo*, con el objetivo de mejorar el límite de cuantificación y debido a su reducido tamaño, se realizó una digestión ácida en tubos de digestión pirex de 50 ml. de capacidad.

La determinación de las concentraciones de cobre en todas las muestras se realizó por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES).

Los detalles de los métodos analíticos empleados, así como el control de calidad analítica empleado durante el experimento, aparecen descritos en detalle en el apartado de material y métodos.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.14.0). La distribución normal de los datos se chequeó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. El efecto de la raza y localización anatómica sobre la distribución de cobre a nivel hepático se evaluó mediante un Modelo General Lineal (MGL). La relación entre la acumulación de cobre en los distintos lóbulos y entre las biopsias *in vivo* y *post mortem* se evaluó empleando el coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos se estableció la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un valor $p < 0,05$.

Resultados

Concentraciones de cobre en las distintas localizaciones hepáticas

En la Tabla 1 aparecen reflejadas las concentraciones de cobre en hígado en las distintas regiones o lóbulos hepáticos considerados en este estudio en los terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

Los resultados del Modelo General Lineal (MGL) para evaluar la influencia de la localización anatómica y la raza sobre la acumulación intrahepática de cobre aparecen reflejados en la Tabla 2.

La raza ejerció un efecto significativo en el análisis ($F_{2,173}=4,594$; $p=0,012$), los terneros de raza Frisona mostraron una concentración de cobre superior ($p < 0,05$) a los terneros de raza Rubia gallega en todos los lóbulos hepáticos, mientras que los

cruces industriales mostraron siempre una posición intermedia entre ambas razas (Tabla 1).

En cuanto a la localización anatómica, si bien no fue un factor significativo en el análisis, debemos señalar que existió una tendencia o patrón de distribución similar en los distintos lóbulos hepáticos para los tres grupos de animales considerados ($F_{5,173}=2,057$; $p=0,074$). Así, podemos señalar que las mayores concentraciones de cobre se situaron siempre en el lóbulo izquierdo, seguido de la apófisis papilar, mientras que los menores niveles de cobre se describen en los lóbulos caudado y cuadrado. Entre las distintas razas, las mayores diferencias de acumulación de cobre entre lóbulos se registraron para la raza Rubia gallega, con un 27% de variación, mientras que para la raza Frisona o los cruces de ambas esta variabilidad fue menor (18 y 15% respectivamente).

Al evaluar la variabilidad en la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos empleando el coeficiente de variación o variación estándar relativa (Figura 1), se observa que ésta es mayor en la apófisis papilar y el lóbulo caudado (con valores próximos al 30%) en comparación con los lóbulos derecho externo e interno e izquierdo (con valores entre el 20 y 25%). Al considerar las distintas razas, se observa que la variabilidad en la acumulación de cobre es menor en el grupo de terneros de raza Rubia gallega (con valores entre 18 y 24%) en comparación con los Frisones o los cruces de ambas razas (con valores entre 20 y 30%).

Al evaluar la asociación existente entre la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos (Tabla 3), observamos una estrecha correlación estadísticamente significativa entre todas las regiones anatómicas consideradas, con coeficientes de correlación superiores a 0,756 ($p=0,000$) en todos los casos, lo que indica una acumulación progresiva de cobre en todo el órgano. Al analizar en detalle y de forma gráfica estas asociaciones (Figura 2) observamos que en el lóbulo izquierdo los animales presentan una mayor acumulación de cobre que alcanza una fase de meseta por encima de 200 mg/kg peso fresco.

Comparación entre los niveles de cobre determinados por biopsia in vivo y post mortem

En la Tabla 4 aparecen reflejadas las concentraciones de cobre en hígado determinadas mediante el procedimiento de biopsia *in vivo* y *post mortem* en los animales de nuestro estudio. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos son muy similares, con una concentración media de 169 y 181mg/kg peso fresco para las determinaciones realizadas mediante biopsia *in vivo* y *post mortem* respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos resultados (Prueba T para igualdad de medias $p=0,281$). El porcentaje de diferencia media entre la concentración de cobre obtenida por ambos procedimientos es baja (9,08%),

y a excepción de una muestra donde encontramos una variación entre ambas determinaciones del 43,1% en el resto de los casos siempre es inferior al 20%. Al analizar la correlación existente entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos observamos una relación lineal muy fuerte entre ambas determinaciones (coeficiente de correlación de Pearson= 0,937, $p=0,000$; Figura 3) a lo largo de todo el rango de concentraciones de cobre determinadas en nuestro estudio.

Discusión

Concentraciones de cobre en las distintas localizaciones hepáticas

Cómo se comentó anteriormente, diversas investigaciones demuestran la tendencia hacia una distribución determinada en la acumulación de cobre en hígado cuando los animales se exponen a altas concentraciones del mismo. Kumaratilake y Howell (1986) hacen referencia a una mayor concentración de cobre y un mayor tamaño de los hepatocitos con gránulos de cobre en la zona central y media del lobulillo hepático, mientras que las células de defensa, como son las de Kupffer y los macrófagos con gránulos de cobre, se localizan en mayor cantidad rodeando la tríada portal. Estos autores observaron también que el número y tamaño de los gránulos difería entre los hepatocitos de distintas zonas; así, a bajas concentraciones de cobre hepático, la mayor intensidad de gránulos se encontraron en los hepatocitos de la zona centrolobulillar, particularmente adyacentes a la vena central. A medida que la concentración de cobre se incrementa, el número de hepatocitos con gránulos, así como el tamaño de los mismos, aumenta y se extiende a través de la zona media del lobulillo hacia la tríada portal. En conclusión, en biopsias con altos contenidos de cobre, aparecen hepatocitos con gránulos en las tres zonas de los lobulillos, pero la mayoría en la zona centrolobulillar y mediolobulillar, contrariamente a lo que sucede con las células de Kupffer y macrófagos, que aparecen mayormente teñidos los de la zona periportal.

Esta diferencia en la distribución de cobre podría encontrar justificación en la circulación del lobulillo hepático. El hígado se encuentra recubierto por una cápsula fibroconjuntiva revestida por una serosa derivada del peritoneo visceral denominada cápsula de Glisson, ésta se hace más gruesa a nivel del hilio del órgano por donde penetra para emitir tabiques o septos que dividen al órgano en lóbulos y lobulillos. El lobulillo hepático (Figura 4) es la unidad estructural organizada alrededor de una vena central que se delimita por la confluencia de los sinusoides hepáticos, que drenan la sangre mezclada procedente de una rama de la vena porta y otra rama de la arteria hepática. El otro elemento estructural del lobulillo lo constituyen los canalículos biliares formados a nivel del borde interno de ambas filas de hepatocitos por la invaginación de su membrana citoplasmática, estructura no visible al

microscopio óptico, que funciona como un canal para vehiculizar la bilis secretada por los hepatocitos y sacarla hacia los espacios portas donde se localizan los conductos excretores para la bilis. Estos lobulillos tienen un aspecto hexagonal bien delimitado en los hígados de cerdos por la presencia de gruesas trabéculas interlobulillares, mientras que en el resto de las especies (en condiciones fisiológicas) es muy difícil diferenciar sus contornos y se localizan, entonces, guiándose por la vena central. Las áreas portales o espacios portas están situados por fuera de los lobulillos en alrededor de tres de los seis ángulos del mismo (Vega, 1980; Lagman, 1984; Ham, 1985; Junqueira, 1996).

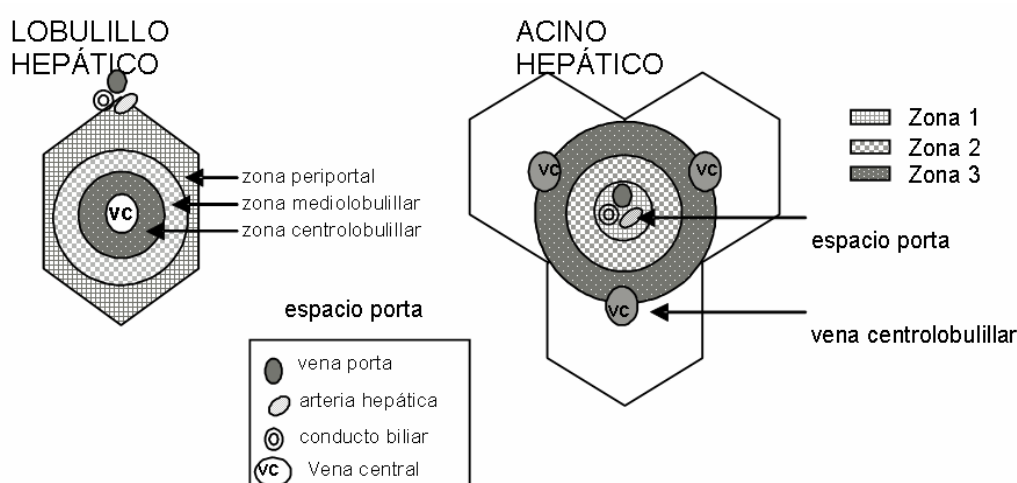


Figura 4. Estructura del lobulillo y acino hepático

Con respecto a la circulación hepática sabemos que la vena porta llega al hígado transportando los compuestos absorbidos en el intestino y en el estómago, e incluyendo las sustancias que podrían causar toxicidad. Al hígado también llega la arteria hepática, la cual transporta hasta un 25% del gasto cardíaco y se encarga de oxigenar todos sus tejidos. Así pues, la unidad funcional del hígado está formada por tres vasos (la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar) y los hepatocitos que los rodean. Se define, entonces, *acino hepático* (Figura 4) a la zona oval cuyo eje gira alrededor de la vena porta y los polos del óvalo son las venas centrales de dos lobulillos hepáticos, y en el que destacan tres zonas de diversa actividad metabólica entre el eje y la vena central de un lobulillo justificadas por la disminución del aporte de oxígeno y de nutrientes conforme la sangre fluye desde el espacio porta hacia la vena central. Teniendo en cuenta la estructura del lobulillo hepático, las células que están más próximas a la vena central (zona III) reciben menos oxígeno y nutrientes que las que están periféricamente en el lobulillo (zona I), donde vierte la

sangre la rama de la arteria hepática y de la vena porta para formar los sinusoides (inicio del capilar sanguíneo). De esta forma, las sustancias que se bioactivan por medio del oxígeno son más peligrosas en la zona I. Por el contrario, en la zona III (pericentral) la concentración de oxígeno es menor pero la actividad citocromo P-450 alta, lo que favorece las condiciones para que se presenten reacciones de reducción catalizadas por esta enzima, lo que hace que las sustancias que se bioactivan en estas condiciones pueden producir daño en esta región.

La mayor acumulación de cobre en la zona centrolobulillar podría estar por tanto justificada por un menor aporte de oxígeno, lo que lleva a una menor actividad metabólica para la eliminación de cobre a través de la bilis, fundamentalmente usando la vía lisosomal (Gooneratne et. al, 1989b). Sin embargo, es también posible que la eliminación de cobre a través de la bilis se vea más favorecida en aquellos hepatocitos que se encuentran más próximos a la triada portal y más ralentizado en las zonas del lobulillo hepático más alejadas de dicho espacio, es decir, en la zona centrolobulillar. La captación de cobre por parte de las células de Kupffer y los macrófagos en fases iniciales de la acumulación crónica de cobre obedece también a la actividad de las mismas, puesto que al ser células fagocíticas están lógicamente en primera línea de defensa rodeando a la rama de la vena porta, que trae todos los agentes patógenos provenientes del aparato digestivo.

La información de la que se dispone acerca de la distribución de cobre en los lóbulos hepáticos en animales expuestos a altos niveles de cobre es muy limitada. Humann-Ziebank et al. (2001) en un estudio llevado a cabo en ganado ovino que recibía suplementación de cobre no observaron diferencias (coeficiente de variación: 13,6 %) en la acumulación de cobre entre el lóbulo izquierdo, el lóbulo derecho y la zona periférica de la vena porta. En nuestro estudio, si bien no encontramos variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de cobre en los distintos lóbulos hepáticos, el hecho de que exista una tendencia a un menor acúmulo de cobre en los lóbulos caudado y cuadrado podría también estar justificado por una mayor proximidad de los mismos a los grandes vasos, lo que garantizaría un mayor aporte de oxígeno y por tanto actividad metabólica, así como una mayor capacidad de drenaje biliar. Por el contrario, la mayor acumulación de cobre ocurre en todos los grupos de animales en el lóbulo izquierdo, más alejado de los grandes vasos, y por tanto con una capacidad de excreción biliar más limitada.

Además, merece especial atención el hecho de que en el lóbulo izquierdo a partir de una concentración de cobre de 200 mg/kg peso fresco se alcance una fase de meseta (Figura 2), lo que podría indicar que a partir de esa concentración el patrón de acumulación de cobre a nivel hepático podría cambiar, dando lugar a un mayor acúmulo en otras localizaciones. Para confirmar esta hipótesis deberíamos realizar más investigaciones en animales con mayores acúmulos de cobre.

Con respecto a la raza, si bien es un factor significativo en el análisis—la raza Frisona presenta una acumulación de cobre a nivel hepático superior a la Rubia gallega, mostrando los cruces entre ambas una posición intermedia entre las mismas—no determina diferencias significativas en la acumulación de cobre dentro del hígado. Estos resultados indican que las diferencias de acumulación de cobre en el hígado se deben a un balance diferente entre la absorción intestinal y la excreción biliar y/o redistribución tisular más que a posibles diferencias en la circulación sanguínea y biliar entre las distintas razas.

Comparación entre los niveles de cobre determinados por biopsia in vivo y post mortem

La mayoría de los autores coinciden en que la concentración del cobre hepático es el indicador más sensible del estatus de cobre de los animales, ya que aproximadamente el 50-60% del cobre total del organismo está almacenado en el hígado. Si bien, es el parámetro más indicado para monitorizar a los animales tiene como principal limitación para su empleo la obtención de las muestras en los animales vivos por medio de la biopsia hepática, que aunque no implica una técnica demasiado compleja, requiere un mayor manejo de los animales en comparación con las muestras de sangre. Además, se dudaba de su capacidad de reflejar la verdadera concentración de cobre hepático y/o de ser representativo de la concentración de cobre en cualquier parte del hígado y no solo del lóbulo derecho externo (punto de biopsia). Los resultados de nuestro estudio indican que la muestra obtenida por biopsia *in vivo* es representativa de la acumulación de cobre a nivel de todo el órgano, con una variación de solo el 5% con respecto a una muestra de mayor tamaño procedente de la misma región anatómica y obtenida post-mortem. Estos resultados nos permiten por lo tanto señalar que la biopsia hepática *in vivo* resultaría un procedimiento adecuado para la determinación de la acumulación de cobre a nivel hepático en ganado vacuno en las condiciones de este estudio.

Tabla 1. Concentraciones de cobre en hígado (mg/kg peso fresco) en las distintas regiones anatómicas (AP: apófisis papilar, CA: lóbulo caudado, CU: lóbulo cuadrado; DE: lóbulo derecho externo, DI: lóbulo derecho interno; I: lóbulo izquierdo) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

		Región anatómica						Total
		AP	CA	CU	DE	DI	I	
Rubia gallega								
	N	10	10	10	10	10	10	60
	Media	167	140	154	158	157	178	159
	ES	10	9	10	10	11	13	4
	MG	165	137	152	155	154	174	156
	Mínimo	137	103	116	123	111	130	103
	Máximo	217	197	208	209	222	250	250
Frisona								
	N	9	9	9	9	9	9	54
	Media	190	174	168	180	181	199	182
	ES	17	17	16	13	16	16	6
	MG	183	165	161	175	174	194	176
	Mínimo	100	79	82	94	86	115	79
	Máximo	257	253	229	219	248	250	257
Cruce								
	N	10	10	10	10	10	10	60
	Media	180	166	164	167	170	188	173
	ES	15	15	10	12	11	12	5
	MG	174	160	161	163	167	184	169
	Mínimo	95	102	111	111	122	126	95
	Máximo	270	252	215	242	211	249	270
Total								
	N	29	29	29	29	29	29	174
	Media	179	159	162	168	169	188	171
	ES	8	8	7	7	7	8	3
	MG	173	153	158	164	165	184	167
	Mínimo	95	79	82	94	86	115	79
	Máximo	270	253	229	242	248	250	270

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 2. Resultados del Modelo General Lineal (MGL) para las concentraciones de cobre en hígado considerando como variables el lóbulo hepático y la raza de los animales.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	33617,15	17	1977,47	1,203	,268
Intersección	5086807,96	1	5086807,9	3095,441	,000
raza	15100,32	2	7550,16	4,594	,012
lóbulo	16898,91	5	3379,78	2,057	,074
raza * lóbulo	1587,12	10	158,71	,097	1,000
Error	256358,28	156	1643,32		
Total	5367464,38	174			
Total corregida	289975,43	173			

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson para las concentraciones de cobre en los distintos lóbulos hepáticos (AP: apófisis papilar, CA: lóbulo caudado, CU: lóbulo cuadrado; DE: lóbulo derecho externo, DI: lóbulo derecho interno; I: lóbulo izquierdo) (n=29).

	AP	CA	CU	DE	DI
CA	,800(***)				
CU	,933(***)	,795(***)			
DE	,939(***)	,840(***)	,913(***)		
DI	,936(***)	,805(***)	,933(***)	,934(***)	
I	,939(***)	,756(***)	,936(***)	,928(***)	,946(***)

*** p < 0,001

Tabla 4. Concentraciones de cobre (mg/kg peso fresco) en hígado determinadas mediante el procedimiento de biopsia *in vivo* y *post mortem*.

	Biopsia <i>in vivo</i>	Biopsia <i>post mortem</i>	Diferencia (%)
N	29	29	29
Media±ES	169±8	182±8	9,08±1,79
MG	164	177	5,32
Mínimo	96	99	0,34
Máximo	255	252	43,1

ES: error estándar; MG: media geométrica

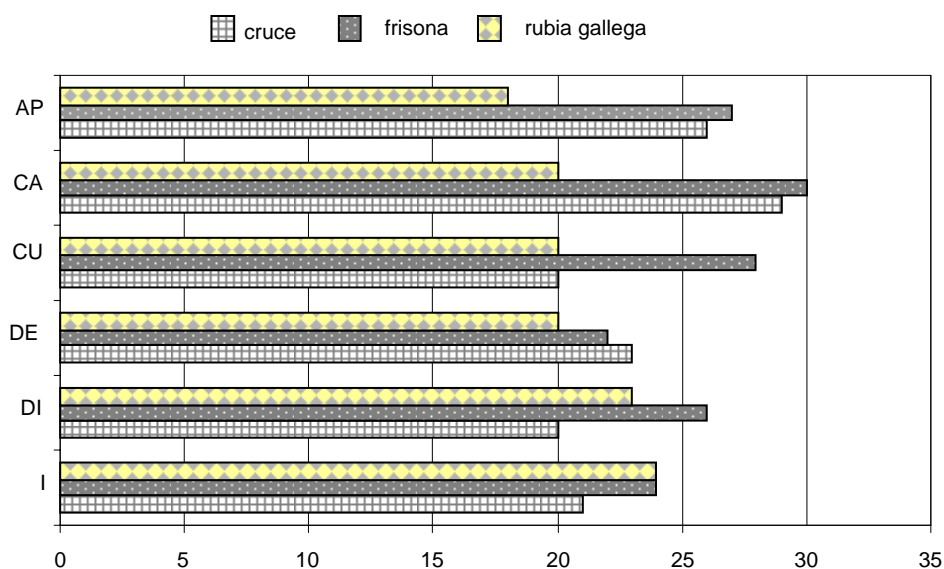


Figura 1. Variación en la acumulación de cobre en las distintas regiones anatómicas del hígado (AP: apófisis papilar, CA: lóbulo caudado, CU: lóbulo cuadrado; DE: lóbulo derecho externo, DI: lóbulo derecho interno; I: lóbulo izquierdo) en las razas consideradas en este estudio, expresada como coeficiente de variación o desviación standard relativa.

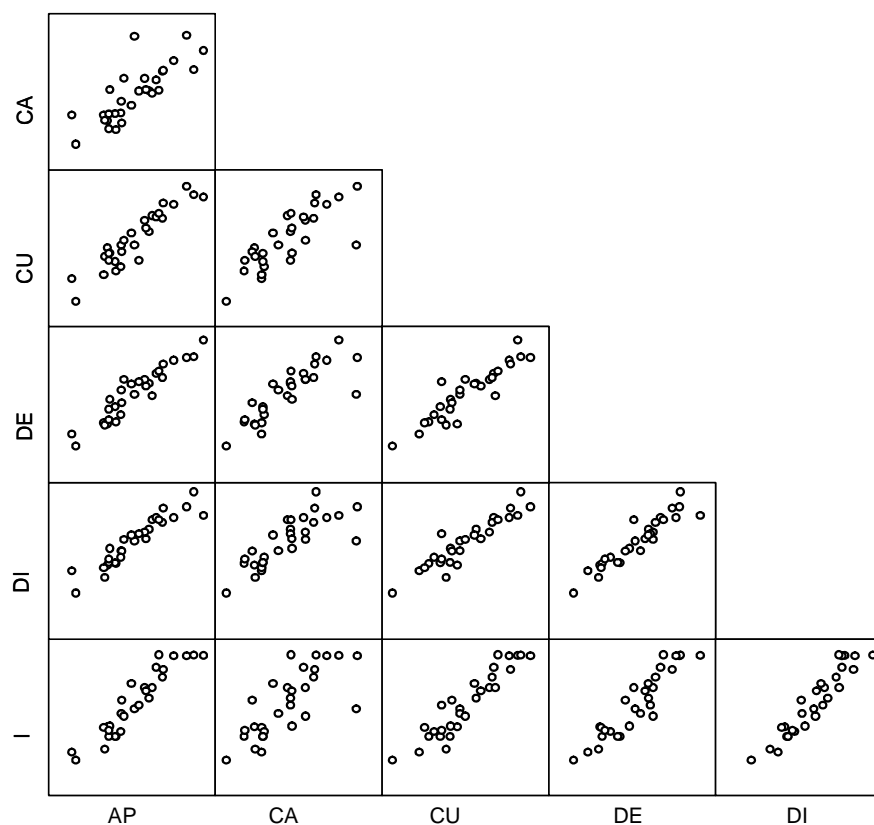


Figura 2. Gráficos de dispersión para la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos (AP: apófisis papilar, CA: lóbulo caudado, CU: lóbulo cuadrado; DE: lóbulo derecho externo, DI: lóbulo derecho interno; I: lóbulo izquierdo).

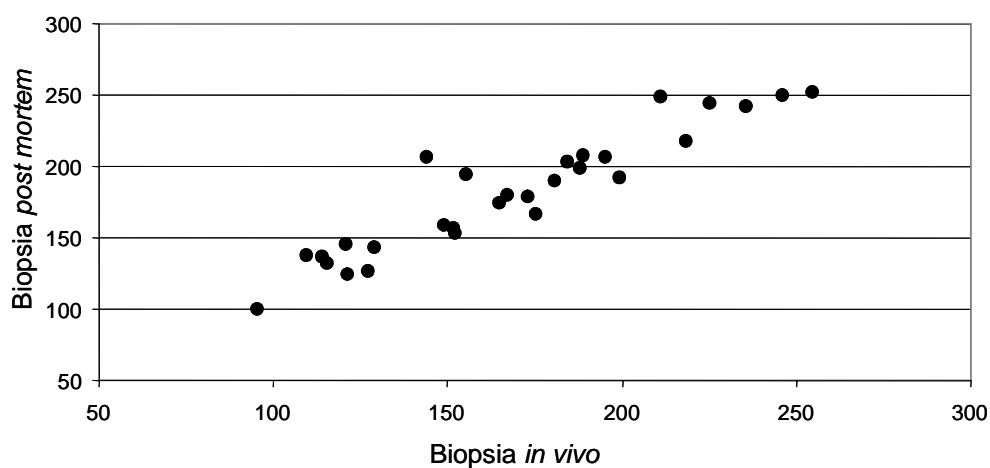


Figura 3. Relación entre la concentración de cobre (mg/kg peso fresco) obtenida en muestras de hígado empleando los procedimientos de biopsia in vivo y post mortem. Coeficiente de correlación de Pearson= 0,937, $p=0,000$.

Capítulo IV

Distribución subcelular de cobre: fraccionamiento subcelular y concentración de metalotioneínas

Debido a la susceptibilidad de los ovinos a la intoxicación crónica por cobre y a la similitud de este proceso con enfermedades hereditarias en medicina humana, el metabolismo hepático de cobre ha sido bien estudiado en esta especie animal (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979, 1980; Kumaratilake y Howell, 1987, 1989; Haywood et al., 2001). Se cree que dicha susceptibilidad podría ser debida a la incapacidad de esta especie animal para acumular grandes cantidades de cobre como metalotioneínas (MT) en el hígado. Cuando el cobre es absorbido en el intestino, entra en el hígado donde es utilizado en el metabolismo normal, almacenado ligado a metalotioneínas o, si el balance es positivo, excretado hacia la bilis (Bremner, 1991a). Las metalotioneínas parecen jugar un papel esencial en la excreción de cobre hacia la bilis, ya sea por una vía directa a través del citoplasma del hepatocito o bien, de forma más importante, a través de la vía hepatolisosomal en la cual el cobre unido a metalotioneínas es secuestrado por los lisosomas para ser excretado a través de la bilis (Gooneratne et al., 1989b). Si hay un gran acúmulo de cobre dentro del hígado, la capacidad de las metalotioneínas para ligarlo y de los lisosomas para eliminarlo del citosol pueden verse excedidas y el cobre comienza a almacenarse en mayor medida en otras organelas (principalmente en el núcleo) o, incluso a concentraciones mayores, permanecer libre en el citosol, siendo responsable en ambos casos de severos cambios en la estructura y función hepática (Bremner 1991, 1998).

En el ganado vacuno, resultados previos de nuestro grupo de investigación (López Alonso et al., 2005 a,b) sugieren que la susceptibilidad a padecer procesos de intoxicación por cobre también podría deberse a la baja capacidad de esta especie animal para inducir la síntesis de metalotioneínas y permitir su eliminación vía biliar.

El objetivo de este experimento es determinar si existen diferencias raciales en la concentración de metalotioneínas, así como en la distribución subcelular de cobre a nivel hepático en ganado vacuno que puedan condicionar la distinta susceptibilidad de estos animales a acumular cobre a nivel hepático, y por tanto sufrir procesos de intoxicación crónica por cobre.

Material y métodos

Muestras

Para este estudio se seleccionaron muestras de hígado del lóbulo caudado, riñón y cerebro tomadas inmediatamente después del sacrificio de todos los animales (n=29) y ultracongeladas en nitrógeno líquido a -196°C.

Métodos

La concentración de metalotioneínas se determinó empleando una modificación del método de saturación de plata (Scheuhammer y Cherian, 1991).

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo empleando una adaptación de la técnica descrita por Corbett et al. (1978).

La determinación de las concentraciones totales de cobre y zinc en el hígado, así como en las distintas subfracciones celulares, se realizó por Espectroscopia de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES) tras someter las muestras a una digestión ácida en microondas.

La concentración de cobre y zinc ligado a metalotioneínas a nivel hepático se asumió que era aquella presente en el citosol después de someter éste a un tratamiento térmico (Suzuki et al., 1994).

Los detalles de los métodos analíticos empleados, así como el control de calidad analítica empleado durante el experimento, aparecen descritos en detalle en el apartado de material y métodos.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.14.0). La distribución normal de los datos se chequeó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. El efecto de la raza sobre la concentración de metalotioneínas y el contenido de cobre en las distintas fracciones subcelulares se evaluó mediante un análisis de varianza de una vía. Las relaciones existentes entre las concentraciones de metalotioneínas y cobre y zinc en el hígado, así como entre las concentraciones de cobre en las distintas subfracciones celulares en relación al contenido total de cobre en el hígado se evaluaron mediante análisis de regresión.

Resultados

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de metalotioneínas en hígado, riñón y cerebro en terneros de razas Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas. A nivel hepático encontramos una gran variabilidad individual en las concentraciones de metalotioneínas con valores situados entre 290 y 2708 mg/kg peso fresco. Al evaluar el efecto de la raza, observamos que los terneros de raza Rubia gallega

presentaron la menor concentración de metalotioneínas (570 mg/kg), seguidos de los de raza Frisona (728 mg/kg) y los cruces industriales de ambas razas (903 mg/kg), si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas ($F_{2,28} = 1,534$, $p=0,235$). A nivel renal, las concentraciones de metalotioneínas fueron superiores a las descritas en el hígado (29% en el conjunto de los animales); en este órgano los terneros de raza Rubia gallega (820 mg/kg) presentaron niveles significativamente inferiores a los de raza Frisona (1136 mg/kg; $F_{2,27}=4,776$, $p=0,018$) y los cruces mostraron una posición intermedia entre ambas razas (928 mg/kg). Finalmente, el cerebro fue el tejido que mostró las menores concentraciones de metalotioneínas (626 mg/kg en el conjunto de los animales) con valores medios muy similares en los tres grupos considerados ($F_{2,27}=0,354$, $p=0,705$).

Al evaluar la concentración de cobre ligado a metalotioneínas a nivel hepático (Tabla 2) observamos que los terneros de raza Frisona (9,63 mg/kg peso fresco) presentan valores superiores a los de raza Rubia gallega (6,62 mg/kg) mostrando una vez más los cruces (8,00 mg/kg) una posición intermedia entre ambas razas, si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas ($F_{2,26}=1,327$, $p=0,284$). La concentración de cobre ligado a metalotioneínas representa un pequeño porcentaje del total del metal acumulado en el hígado, con valores medios del 5,09, 7,74 y 5,97 % para los terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($F_{2,26}=1,189$, $p=0,322$).

Al evaluar la relación entre la concentración de metalotioneínas y los niveles de cobre y zinc a nivel hepático en los terneros de este estudio (Figura 1) observamos que las concentraciones de metalotioneínas no están correlacionadas ($R= 0,203$, $F_{1,28}=1,157$, $p = 0,292$) con el contenido total de cobre en el hígado. Por el contrario, las concentraciones de metalotioneínas están fuertemente asociadas ($R= 0,897$, $F_{1,28} =111,365$, $p =0,000$) con las concentraciones totales de zinc en el hígado y pueden expresarse mediante la siguiente ecuación: $y = 27,074 + 0,020x$, donde y es la concentración de zinc en el hígado (mg/kg peso fresco) y x es la concentración de metalotioneínas en el hígado (mg/kg peso fresco). Cuando se analiza el contenido de metal ligado a las metalotioneínas se observa, sin embargo, que tanto el cobre-metalotioneínas como el zinc-metalotioneínas, están directamente asociados con la concentración de metalotioneínas presentes en el hígado (Figura 1). Estas asociaciones pueden ser expresadas utilizando las siguientes ecuaciones: (a) $y = 0,013x - 0,748$ ($R= 0,910$, $F_{1,27} = 125,015$, $p = 0,000$), donde y es la concentración de cobre-metalotioneínas en el hígado (mg/kg peso fresco) y x es la concentración de metalotioneínas en el hígado (mg/kg peso fresco); (b) $y = 1,49 + 0,004x$ ($R = 0,652$, $F_{1,26} =19,27$, $p = 0,000$), donde y es la concentración de zinc-metalotioneínas en el hígado (mg/kg peso fresco) y x es la concentración de metalotioneínas en el hígado

(mg/kg peso fresco). Cuando se analiza el patrón de distribución de la concentración de cobre y zinc, como concentraciones totales y ligadas a metalotioneínas, frente a la concentración de metalotioneínas a nivel hepático en las distintas razas consideradas en este estudio (Figura 2), observamos que presentan un comportamiento muy similar: en todas ellas la concentración de metalotioneínas no está relacionada con la concentración total de cobre, siendo altamente dependiente de la concentración total de zinc en la célula; además, en los tres grupos de animales la capacidad del cobre para unirse a las metalotioneínas es función de la concentración de las mismas en la célula hepática.

La proporción de cobre ligado a metalotioneínas (en %) del cobre total en el hígado en los animales de nuestro estudio es altamente dependiente del ratio cobre:zinc en la célula (Figura 3) y puede expresarse mediante la siguiente ecuación: $y = 20,67 - 10,03 \ln(x)$ ($R = 0,422$, $F_{1,26} = 19,013$, $p = 0,000$), donde y es el % de cobre-metalotioneínas en el hígado (mg/kg peso fresco) y x el ratio cobre:zinc en el hígado. Cuando el ratio cobre:zinc es bajo, cerca del 20% del cobre total está ligado a las metalotioneínas, sin embargo ese porcentaje disminuye de forma importante al aumentar el ratio cobre:zinc, siendo menor del 1% a un ratio cobre:zinc de 9.

En el riñón, la concentración de metalotioneínas no está correlacionada con la concentración renal de cobre ($R = -0,071$, $F_{1,26} = 0,131$, $p = 0,720$) aunque si presenta una asociación estadísticamente significativa con la concentración de zinc ($R = 0,489$, $F_{1,26} = 8,178$, $p = 0,008$; Figura 4) que puede expresarse mediante la siguiente ecuación: $y = 13,144 + 0,004 x$, donde y es la concentración de zinc en el riñón (mg/kg peso fresco) y x es la concentración de metalotioneínas en el riñón (mg/kg peso fresco). Además, la concentración de metalotioneínas a nivel renal está correlacionada positivamente con la concentración total de cobre en el hígado ($R = 0,389$, $F_{1,26} = 4,344$, $p = 0,047$; Figura 5), y puede expresarse mediante la siguiente ecuación: $y = 121,442 + 0,055x$, siendo y la concentración de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco) y x la concentración de metalotioneínas en el riñón (mg/kg peso fresco).

Finalmente, la concentración de metalotioneínas a nivel del cerebro no está correlacionada con los niveles de cobre y zinc en ninguno de los tejidos analizados ($p > 0,05$ en todos los casos).

En la Tabla 3 aparecen representadas las concentraciones de cobre en las distintas fracciones celulares (nuclear, granular, microsomal y citosol), expresados como concentraciones (mg/kg peso fresco) y porcentaje de la concentración total de cobre (%) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces industriales de las mismas. La distribución de cobre en dichos compartimentos subcelulares fue muy similar para los tres grupos de animales, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$). De forma general podemos señalar que la fracción granular fue

el compartimento principal en la acumulación de cobre (representando el 42,2 % del cobre total en el hígado en el conjunto de los animales), seguido del citosol (31,2 %) y del núcleo (15,4 %) mientras que en la fracción microsomal el contenido de cobre era bastante bajo (11,2 %).

En la Figura 6 aparecen representadas las concentraciones de cobre (mg/kg peso fresco) en las distintas fracciones subcelulares en relación al contenido total de cobre en el hígado. El patrón de distribución es muy similar en los grupos de animales considerados y, en general debemos señalar que al aumentar la acumulación de cobre en el hígado, los niveles de cobre se incrementaron en todas las compartimientos subcelulares, aunque la forma de la respuesta varió entre ellos. Los detalles de los modelos matemáticos que mejor explican este comportamiento aparecen reflejados a continuación: $y = 17,795 - 0,141 x + 0,001 x^2$ ($R = 0,731$, $F_{1,25} = 33,992$, $p = 0,000$) donde y es la concentración de cobre en el núcleo (mg/kg peso fresco) y x es la concentración total de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco); $y = -270,928 + 66,859 \ln(x)$ ($R = 0,654$, $F_{1,26} = 44,063$, $p = 0,000$) donde y es la concentración de cobre en la fracción granular (mg/kg peso fresco) y x es la concentración total de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco); $y = -0,671 x^{0,64}$ ($R = 0,261$, $F_{1,26} = 9,170$, $p = 0,005$) donde y es la concentración de cobre en la fracción microsomal (mg/kg peso fresco) y x es la concentración total de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco); $y = -0,353 x^{0,974}$ ($R = 0,647$, $F_{1,26} = 47,723$, $p = 0,000$) donde y es la concentración de cobre en el citosol (mg/kg peso fresco) y x es la concentración total de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco).

Discusión

Está bien establecido que las marcadas diferencias que existen entre las especies animales a la toxicidad por cobre están fuertemente relacionadas con su habilidad o capacidad para sintetizar metalotioneínas y de acumular cobre ligado a estas. De esta forma, la toxicidad por cobre es muy reducida en el hígado de aquellas especies, como el perro o el cerdo, en las cuales la mayor parte del cobre hepático está ligado a metalotioneínas (Mehra y Bremner, 1984; Bremner y Beattie, 1990) y es muy alta en otras, como la oveja, en las cuales solo una pequeña proporción de metal está ligado de esta forma. Sin embargo, se desconoce si las diferencias raciales en la susceptibilidad a la acumulación crónica de cobre, bien descritas en ganado ovino y en menor medida en vacuno, se deben a una distinta capacidad para sintetizar metalotioneínas.

Los resultados de este estudio indican que las diferencias observadas entre razas en la acumulación de cobre a nivel hepático no parecen ser dependientes de una distinta habilidad o capacidad de las mismas para inducir la síntesis de metalotioneínas. Aunque en general, los terneros de raza Rubia gallega son los que

presentan las menores concentraciones de metalotioneínas, así como cobre ligado a las mismas, las diferencias observadas con los terneros de raza Frisona o los cruces entre ambas no alcanzan significación estadística.

Al igual que hemos descrito en investigaciones previas (López-Alonso et al., 2005a), los niveles de metalotioneínas en hígado en este estudio no están directamente asociados con el nivel o grado de acumulación de cobre, lo que indica que el cobre es un pobre inductor de la síntesis de metalotioneínas en este órgano. Aunque se ha demostrado que el cobre puede inducir la síntesis de metalotioneínas en animales de laboratorio, esto solo sucede cuando se administra a dosis muy elevadas, como en inyecciones intraperitoneales, y que las variaciones en los niveles de cobre en la dieta presentan un pequeño efecto sobre la expresión de metalotioneínas en el hígado hasta que los niveles de cobre son extremadamente altos (Mercer, 1997). Sin embargo, la mayor parte de las especies animales, incluidos los rumiantes, tienen una escasa capacidad para inducir la síntesis de metalotioneínas en respuesta a un incremento de cobre en la dieta (Saylor et al., 1980; Bremner y Beattie, 1995), incluso a concentraciones muy elevadas.

Por el contrario, las concentraciones de metalotioneínas en los tres grupos o lotes de terneros considerados en nuestro estudio son altamente dependientes del estatus de zinc del animal. Está bien demostrado que los niveles de zinc en el hígado son extremadamente importantes en el control de la síntesis y degradación de las metalotioneínas en la mayor parte de las especies animales (Bremner, 1980); así, las concentraciones de metalotioneínas en el hepatocito son muy bajas en animales que presentan una deficiencia de zinc y la síntesis de metalotioneínas está fuertemente estimulada cuando añaden suplementos de zinc en las dietas animales (Saylor et al., 1980; Bremner y Beattie, 1990; Lee et al., 1994).

Aunque el cobre es un pobre inductor de la síntesis de metalotioneínas, este metal se puede unir a las metaloproteínas compitiendo con el zinc por los lugares de unión de las mismas. Esto es debido a que el cobre presenta una mayor afinidad que el zinc por los puntos de fijación y puede competir por ellos y desplazar al zinc, incluso aunque haya sido este segundo metal el que haya inducido su síntesis (Bremner y Beattie, 1995; Bremner, 1998). De esta forma, aunque el zinc es esencial para inducir la síntesis de metalotioneínas, en presencia de cobre debe entenderse que pasa a jugar solo un papel pasivo en la unión a las metalotioneínas con el objetivo de completar los lugares de unión de las mismas y mantener de esta forma la estructura tridimensional de la proteína (Bremner y Beattie, 1995). Más aún, la cantidad de cobre ligado a metalotioneínas va a ser altamente dependiente del estatus de zinc del animal, y la cantidad de cobre-metalotioneínas puede calcularse de forma precisa como una función del estatus de zinc del animal (López-Alonso, 2005a). Aunque existen diferencias importantes entre especies en cuanto a la capacidad del

cobre para unirse a las metalotioneínas, la suplementación de zinc en la dieta incrementa el porcentaje de cobre-metalotioneínas y, por el contrario, no encontramos cobre ligado a metalotioneínas en el hígado de animales deficientes en zinc, incluso en especies como el perro o el cerdo en donde un 80% del cobre hepático puede estar presente en forma de cobre-metalotioneínas cuando el estatus de zinc es adecuado (Bremner, 1987; 1998).

La proporción de cobre ligado a metalotioneínas del total presente en la célula hepática es muy bajo en todos los animales de este estudio (ca. 6%) y altamente dependiente del ratio cobre:zinc en la célula. Estos resultados son coincidentes con los descritos en experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en animales expuestos a niveles diferentes de cobre y zinc en la dieta (López-Alonso et al., 2005a) e indican que los rumiantes tienen una escasa capacidad para acumular cobre en el hepatocito ligado a metalotioneínas, capacidad que va a ser altamente dependiente de la concentración total de zinc, que a su vez es la que realmente determina la concentración de metalotioneínas en la célula.

A diferencia de lo que ocurre a nivel hepático, en este estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de metalotioneínas a nivel renal, donde los terneros de raza Frisona presentan niveles superiores a los de la raza Rubia gallega, estando los cruces en una posición intermedia entre ambas razas. En nuestro estudio, la concentración de metalotioneínas a nivel renal está correlacionada con la concentración de zinc aunque no con la concentración de cobre, lo que posiblemente indica que al igual que en el hígado, el zinc es el principal inductor de metalotioneínas en este órgano. Sin embargo, el dato más llamativo que encontramos en este estudio es que la concentración de metalotioneínas a nivel renal está correlacionada positivamente con la concentración total de cobre en el hígado; resultados similares han sido descritos previamente por nuestro grupo de investigación en ganado porcino (datos sin publicar) y podrían estar asociados al metabolismo de los complejos Cu-metalotioneínas; así se ha demostrado a nivel experimental que tras la administración parenteral de complejos Cu-metalotioneínas, éstos se excretan de forma intacta por orina o se absorben a nivel renal donde son degradados (Bremner, 1979). De la misma forma, estudios experimentales con animales de laboratorio, sugieren algún grado de acumulación de las distintas metalotioneínas en tejidos específicos, encontrando una alta tendencia para ligar metalotioneínas por parte del cobre a nivel renal y formando complejos que posiblemente tengan un papel en el proceso de reabsorción tubular y en el control de la excreción urinaria del mismo (Bremner et al., 1978).

La distribución de cobre en los distintos compartimentos subcelulares tampoco mostró diferencias significativas entre las razas estudiadas, observándose en todas ellas un patrón común de comportamiento. Así, para todos los grupos considerados, y

al igual que ha sido descrito previamente en ganado ovino (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1989) y vacuno (López-Alonso et al., 2005b) la mayor proporción de cobre se encuentra en la fracción granular, seguida del citosol y núcleo, mientras que en la fracción microsomal el contenido de cobre es muy bajo. Contrariamente, en la mayor parte de las especies de mamíferos, un elevado porcentaje del metal (50% o incluso más) está localizado en el citosol, mientras que la fracción granular representa solo el 20% aproximadamente (Corbett et al., 1978; Evans, 1973; Saylor y Leach, 1980). Estas diferencias en la distribución intracelular de cobre entre vacuno, ovino y otras especies animales menos susceptibles a la intoxicación por cobre podrían ser atribuidas a la capacidad limitada de los rumiantes para sintetizar metalotioneínas (Saylor y Leach, 1980).

Como ha sido descrito previamente en estudios experimentales tanto en ganado vacuno como ovino expuesto a niveles elevados de cobre, la capacidad de las distintas fracciones subcelulares para acumular cobre varió al aumentar la acumulación de cobre en el hígado, si bien lo hizo de forma muy similar en todos los grupos raciales estudiados. La variación más importante se registra en la fracción granular, en la cual el incremento de cobre por unidad de cobre almacenado en el conjunto del hígado disminuye progresivamente tendiendo a alcanzar rápidamente una fase de meseta, a una concentración de cobre en el hígado entre 5 y 2 veces por encima de los niveles de cobre adecuados para vacuno (López-Alonso et al., 2005b) y ovino (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Saylor and Leach, 1980) respectivamente. En otras especies menos susceptibles a la intoxicación por cobre como las ratas, donde el cobre ligado a las metalotioneínas es una forma importante de almacenamiento, la fracción granular muestra una gran capacidad para almacenar cobre y continúa comportándose como una función lineal de la concentración total de cobre en el hígado hasta niveles mucho más elevados de almacenamiento hepático, alrededor de 100 veces por encima de las concentraciones de cobre normales para esta especie animal (Corbett et al., 1978). Estos resultados indican que el ganado vacuno, aunque en un menor grado que el ovino, podrían tener una capacidad limitada para acumular cobre en la fracción granular (que contiene los lisosomas), y la saturación de este compartimento subcelular tiende a ocurrir a concentraciones de cobre próximas a los niveles fisiológicos o adecuados comparado con otras especies animales. Para Saylor y Leach (1980) la pobre homeostasis de cobre en ganado ovino, que lo hace especialmente susceptible a padecer procesos de intoxicación crónica de cobre, podría no deberse directamente a la incapacidad de los lisosomas para secuestrar cobre, sino más bien a la falta de síntesis adecuada de metalotioneínas en respuesta a un aumento de exposición a cobre; si este fuese el caso, no habría un incremento de cobre en la fracción granular debido a la falta de complejos cobre-metalotioneínas disponible para su secuestro por parte de los lisosomas.

En los terneros de nuestro estudio, al igual que se ha descrito previamente en ganado ovino (Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake and Howell, 1989; Saylor and Leach, 1980) y vacuno (López-Alonso et al., 2005b), una vez que la acumulación de cobre en la fracción granular comienza a disminuir, el cobre se acumula a mayor velocidad en la fracción nuclear, mostrando un comportamiento muy similar en los tres grupos considerados. Hemos de señalar, no obstante, que este mayor acúmulo de cobre en la fracción nuclear es menos evidente que el observado en investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación en terneros con concentraciones de cobre por encima de los valores de normalidad. Es posible que esto se deba a que en los terneros del presente estudio todavía no se ha alcanzado la fase de meseta a nivel de la fracción granular, momento en el que se hace más pronunciado el aumento de cobre en la fracción nuclear.

En nuestro estudio, se observa que en todos los animales la fracción citosólica continúa acumulando cobre una vez que el secuestro de dicho oligoelemento por parte de los lisosomas disminuye, aunque este cobre no esté ligado a metalotioneínas. Estos resultados son coincidentes con los descritos por Corbett et al. (1978) y Gooneratne et al. (1979) en ovejas, quienes observaron un aumento de cobre en el citosol al aumentar la acumulación de cobre en el hígado. Sin embargo, estos aumentos en la proporción de cobre presente en el citosol no fueron tan marcados como los observados en el núcleo de los animales prehemolíticos, y tampoco se han observado en otros estudios en ovino (Saylor y Leach, 1980; Kumaratilake y Howell, 1989).

Finalmente, debemos señalar que la fracción microsomal juega un pequeño papel en la acumulación de cobre en todos los grupos de animales de nuestro estudio y, al igual que en ganado ovino, el cobre tiende a acumularse a una velocidad menor en esta fracción al aumentar la concentración de cobre total en el hígado (Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1989; Saylor y Leach, 1980).

Tabla 1. Concentraciones de metalotioneínas (MT), expresadas en mg/kg peso fresco, en hígado, riñón y cerebro de terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

		MT hígado	MT riñón	MT cerebro
Rubia Gallega				
	N	10	10	9
	Media	570	820	617
	ES	52	56	29
	MG	549	803	611
	Mínimo	334	546	524
	Máximo	831	1144	768
Frisona				
	N	9	8	9
	Media	728	1136	649
	ES	100	84	34
	MG	672	1113	642
	Mínimo	290	743	496
	Máximo	1311	1406	820
Cruces				
	N	10	10	10
	Media	903	928	613
	ES	204	75	35
	MG	794	905	603
	Mínimo	500	648	451
	Máximo	2708	1527	802
Total				
	N	29	28	28
	Media	734	949	626
	ES	80	47	19
	MG	664	920	618
	Mínimo	290	546	451
	Máximo	2708	1527	820

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 2. Niveles de cobre ligados a metalotioneínas (Cu-MT) en hígado, expresados como concentraciones (mg/kg peso fresco) y porcentaje de la concentración total de cobre (%) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

		Cu-MT	%
Rubia Gallega			
	N	10	10
	Media	6,62	5,09
	ES	0,88	0,64
	MG	6,16	4,74
	Mínimo	3,15	2,39
	Máximo	12,97	8,52
Frisona			
	N	8	8
	Media	9,63	7,74
	ES	1,95	2,12
	MG	8,33	5,99
	Mínimo	4,18	2,05
	Máximo	18,65	19,45
Cruces			
	N	9	9
	Media	8,00	5,97
	ES	1,07	0,66
	MG	7,35	5,68
	Mínimo	2,77	3,15
	Máximo	13,79	9,88
Total			
	N	27	27
	Media	7,97	6,17
	ES	0,76	0,71
	MG	7,14	5,40
	Mínimo	2,77	2,05
	Máximo	18,65	19,45

ES: error estándar; MG: media geométrica

Tabla 3. Concentraciones de cobre en las distintas fracciones celulares (nuclear, granular, microsomal y citosol), expresadas como concentraciones (mg/kg peso fresco) y porcentaje de la concentración total de cobre (%) en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

	Cu total		Cu núcleo		Cu granular		Cu microsomas		Cu citosol	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
Rubia gallega										
N	10		10	10	10	10	10	10	10	10
Media	155,3		21,9	14,0	63,4	41,1	19,2	12,4	50,8	32,5
ES	9,4		2,2	0,9	4,6	2,0	1,9	0,9	4,4	1,7
MG	152,8		21,0	13,7	62,1	40,6	18,5	12,1	49,1	32,1
Mínimo	119,2		12,7	9,3	48,0	32,3	11,9	8,3	35,5	22,9
Máximo	214,2		36,6	17,1	96,5	49,6	32,1	18,7	72,1	40,2
Frisona										
N	8		8	8	8	8	8	8	8	8
Media	170,0		28,6	15,8	70,7	43,1	17,6	10,2	53,1	31,0
ES	16,5		3,8	1,0	9,1	3,4	2,1	1,0	5,6	2,6
MG	163,5		26,7	15,6	66,5	42,0	16,6	9,9	50,5	30,3
Mínimo	85,9		11,7	11,7	41,3	28,3	10,1	6,8	22,9	22,1
Máximo	239,9		48,0	20,2	101,5	54,8	24,2	14,9	69,5	44,7
Cruce										
N	10		10	10	10	10	10	10	10	10
Media	165,2		28,6	16,4	69,5	42,7	17,2	10,9	49,8	30,0
ES	13,9		4,4	1,7	7,3	2,3	1,6	1,2	4,3	1,9
MG	159,8		25,6	15,7	66,2	42,1	16,5	10,3	47,9	29,4
Mínimo	103,4		12,7	10,2	44,7	30,9	9,8	5,4	24,5	20,8
Máximo	246,1		50,2	25,1	112,2	53,7	23,7	18,0	70,0	41,1
Total										
N	28		28	28	28	28	28	28	28	28
Media	163,0		26,2	15,4	67,7	42,2	18,0	11,2	51,1	31,2
ES	7,4		2,1	0,7	3,9	1,4	1,0	0,6	2,6	1,1
MG	158,3		24,1	14,9	64,8	41,6	17,2	10,8	49,1	30,6
Mínimo	85,9		11,7	9,3	41,3	28,3	9,8	5,4	22,9	20,8
Máximo	246,1		50,2	25,1	112,2	54,8	32,1	18,7	72,1	44,7

ES: error estándar; MG: media geométrica

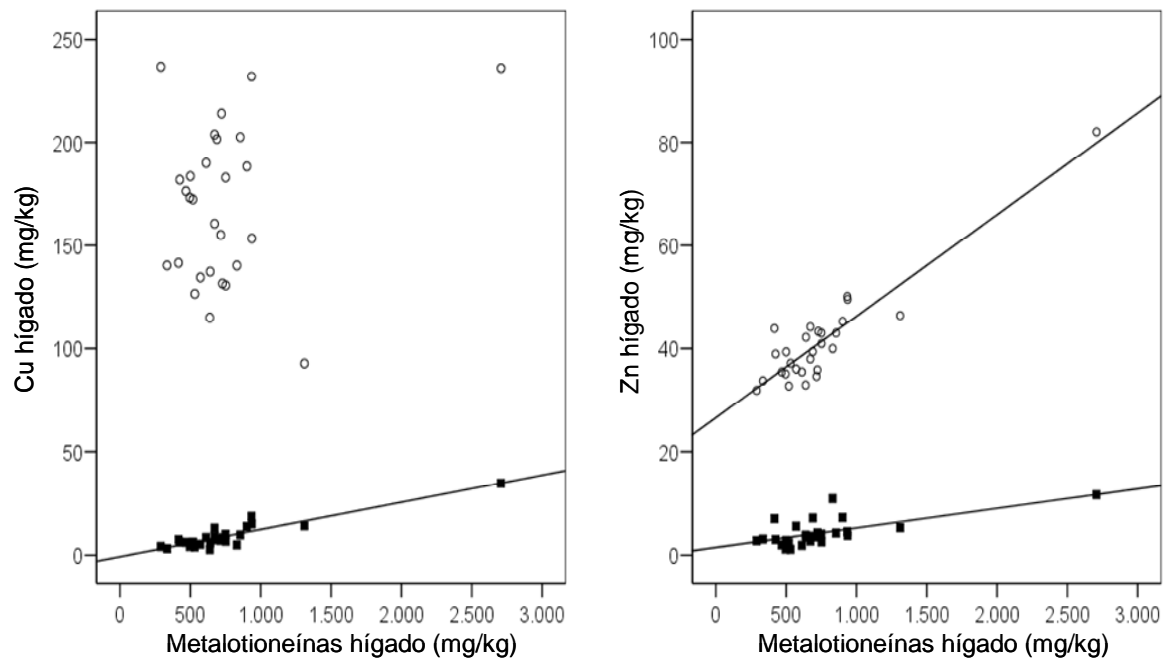


Figura 1. Relación entre las concentraciones de metalotioneínas en hígado (mg/kg peso fresco) y la concentración de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco) (o: cobre total; •: cobre ligado a metalotioneínas) y concentración de zinc en el hígado (mg/kg peso fresco) (o: zinc total; •: zinc ligado a metalotioneínas). Los detalles de los modelos de regresión aparecen descritos en el texto.

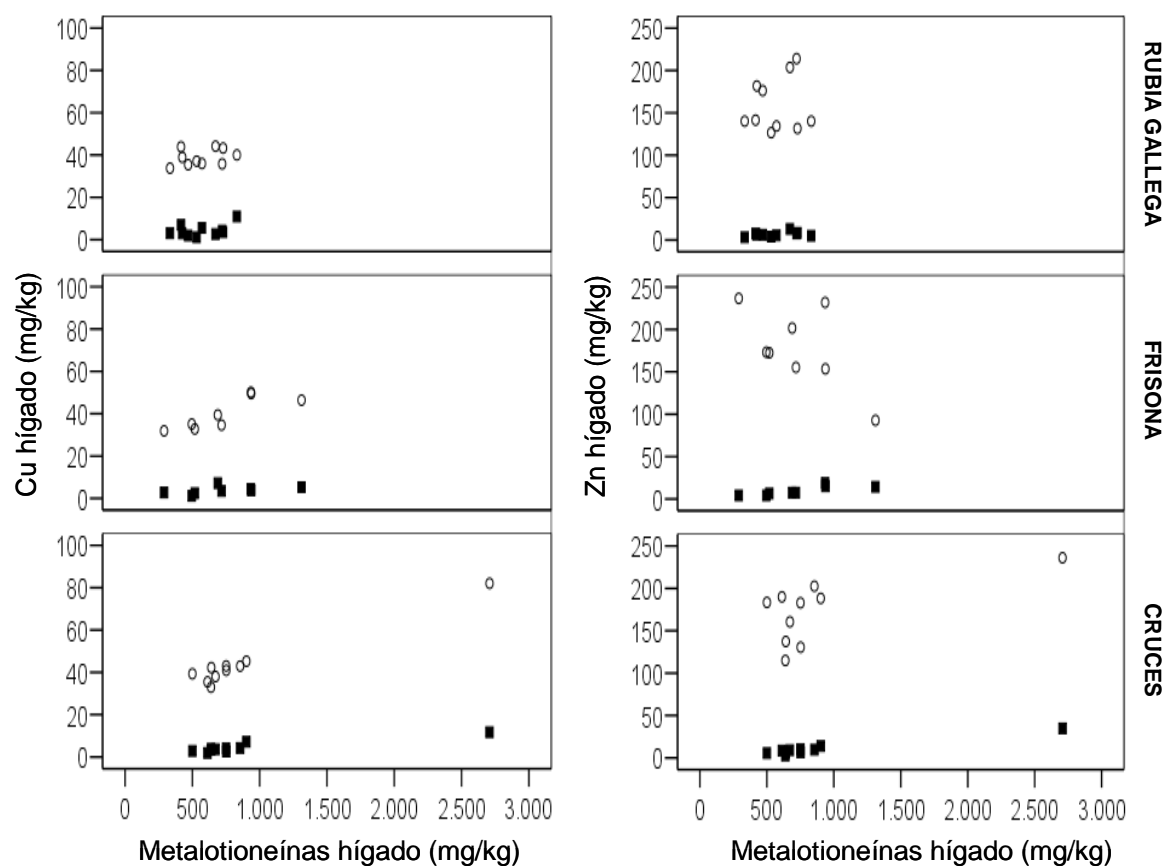


Figura 2. Relación entre las concentraciones de metalotioneínas en hígado (mg/kg peso fresco) y la concentración de cobre en el hígado (mg/kg peso fresco) (o: cobre total; ▪: cobre ligado a metalotioneínas) y concentración de zinc en el hígado (mg/kg peso fresco) (o: zinc total; ▪: zinc ligado a metalotioneínas) en los terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces entre ambas razas.

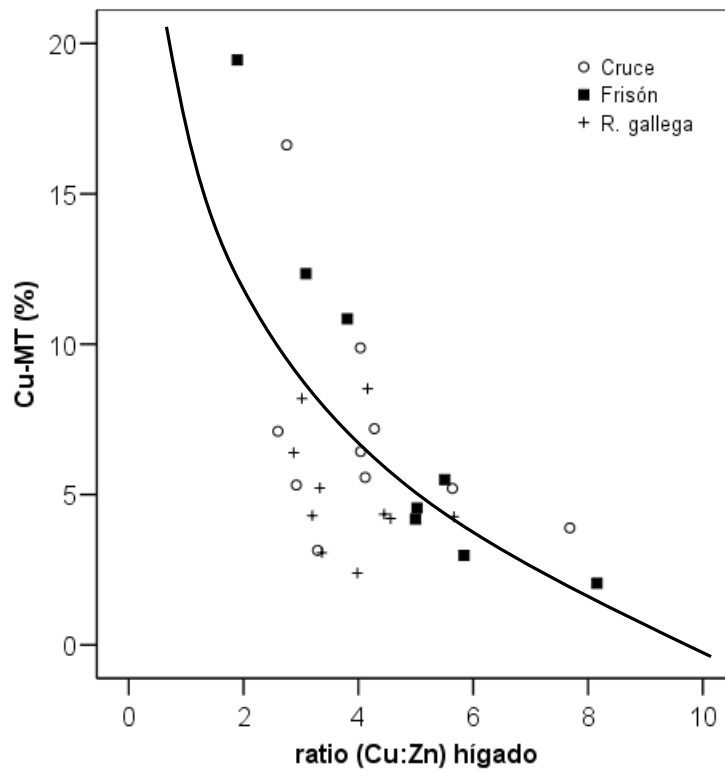


Figura 3. Relación entre la proporción (%) de cobre ligado a metalotioneínas (MT) del total de cobre presente en el hígado y el ratio Cu:Zn (en peso) en el hígado. Los detalles del modelo de regresión aparecen descritos en el texto.

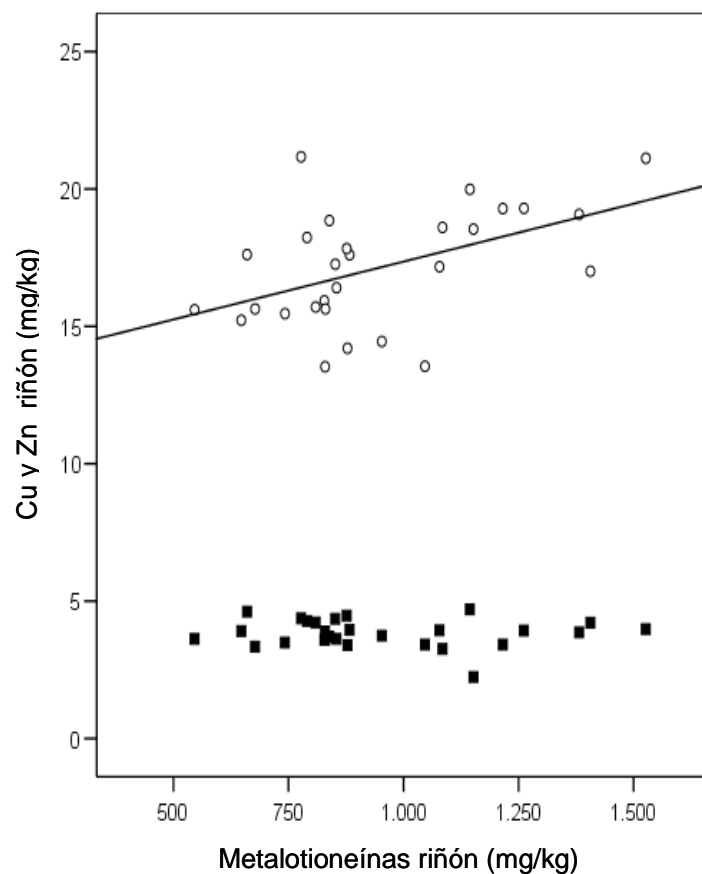


Figura 4. Relación entre las concentraciones de metalotioneínas en riñón (mg/kg peso fresco) y las concentraciones totales de cobre (•) y zinc (o) en riñón (mg/kg peso fresco). Los detalles del modelo de regresión aparecen descritos en el texto.

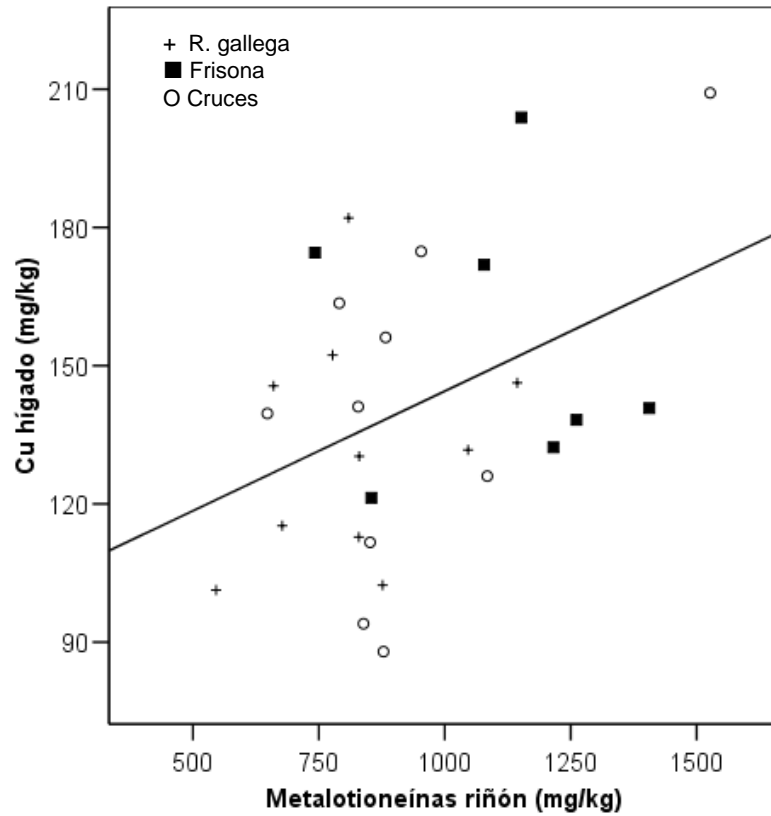


Figura 5. Relación entre las concentraciones de metalotioneínas en riñón (mg/kg peso fresco) y las concentraciones totales de cobre en hígado (mg/kg peso fresco). Los detalles del modelo de regresión aparecen descritos en el texto.

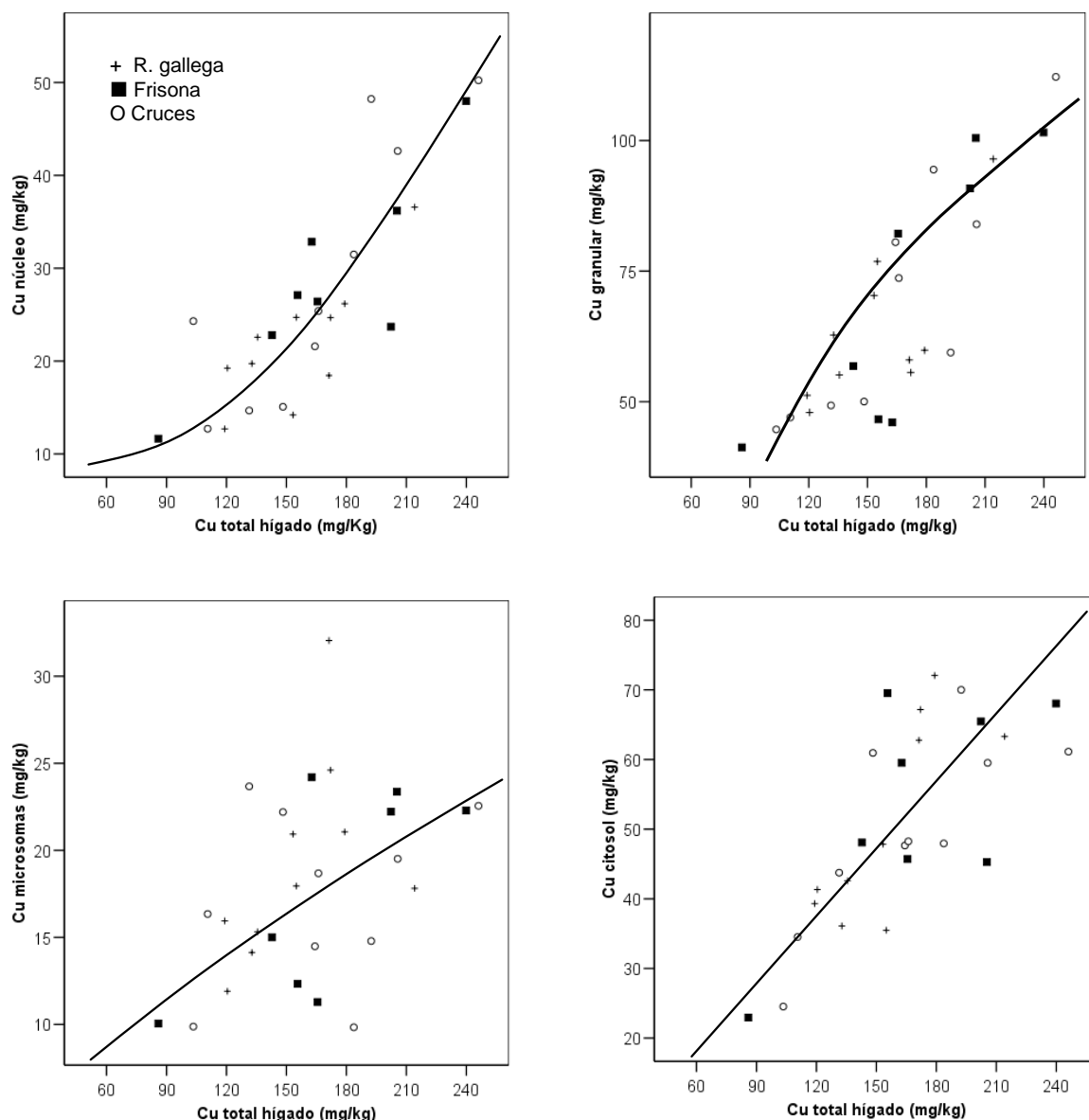


Figura 6. Gráficos de dispersión mostrando los niveles de cobre (mg/kg peso fresco) en las distintas fracciones subcelulares (nuclear, granular, microsomal y citosol) frente a la concentración total de cobre en el hígado. Los detalles del modelo de regresión aparecen descritos en el texto.

Capítulo V

Evaluación de parámetros hematológicos y bioquímicos

A día de hoy uno de los problemas más acuciantes cuando se trata de controlar y/o valorar los problemas subclínicos acarreados por la acumulación crónica de cobre en el organismo, tanto en medicina humana como en veterinaria, es que no hay estudios acerca de medios diagnósticos viables, lo suficientemente sensibles para detectar esta acumulación, ya que las herramientas diagnósticas se han empleado únicamente cuando la enfermedad evoluciona a un proceso clínico (Araya et al., 2003; Ortolani et al., 2003).

Durante la fase clínica de acumulación de cobre se producen alteraciones hematológicas asociadas a la crisis hemolítica (Underwood y Suttle, 2002). Además, en esta fase de la enfermedad ocurre una salida importante de las enzimas contenidas en el interior de los hepatocitos dañados (ASAT, CK, FA, GLDH, GGT, etc.) al torrente sanguíneo. En la actualidad, varios autores han postulado que las enzimas hepáticas podrían ser además marcadores tempranos durante la fase crónica de acumulación de cobre en hígado (Humann-Ziehank et al., 2001; Laven et al., 2004), basándose en el hecho de que durante la fase silente de acumulación un porcentaje pequeño de células hepáticas sufren necrosis, dando lugar a incrementos de las actividades enzimáticas en sangre. Sin embargo, otros autores han encontrado solo una pequeña correlación entre la actividad de las enzimas hepáticas y la concentración de cobre en el hígado (López-Alonso et al., 2006); esto puede deberse a que durante la fase de acumulación crónica de cobre solo unos pocos hepatocitos sufren necrosis en un momento concreto: 0,45% del volumen hepático (Gooneratne et al., 1980), por lo que los incrementos enzimáticos son transitorios, y al menos que haya una monitorización continua de recogida de muestras, estos picos de liberación enzimática pueden no ser registrados (Ortolani et al., 2003).

Investigaciones recientes ponen de manifiesto que la suplementación de cobre a dosis fisiológicas pueden afectar al metabolismo lipídico en rumiantes (Engle et al. 2000a, b; Engle y Spears, 2001), además se ha constatado que el efecto del cobre sobre el metabolismo del colesterol varía entre razas (Engle y Spears, 2001; Engle et al., 2001).

El objetivo que nos planteamos en este capítulo es evaluar las repercusiones orgánicas de la acumulación de cobre a lo largo del ciclo productivo a través de parámetros hematológicos y bioquímicos en las distintas razas.

Material y métodos

Muestras

Para este estudio se emplearon muestras de sangre recogidas a intervalos de tiempo mensuales durante todo el ciclo productivo, desde los 3 meses de vida hasta el momento de sacrificio a los 9-10 meses de edad aproximadamente. Los datos correspondientes a los distintos muestreos aparecen reflejados en el capítulo de material y métodos.

Métodos

Los parámetros hematológicos (glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), glóbulos blancos (GB) y plaquetas (Plaq)) se realizaron en un analizador automático (MS9 Automatic Cell Counter, Melet Schloesing Laboratories).

En todos los muestreos se analizaron el microhematocrito y las proteínas totales por refractometría. Los resultados obtenidos de ambos parámetros fueron muy similares a los obtenidos por el contador automático para el hematocrito (CV=2,17%) y por bioquímica húmeda para proteínas totales (CV=5,40%). Por ello, en este estudio se utilizaron los datos de hematocrito obtenidos por el contador automático y de proteínas totales obtenidas por bioquímica húmeda.

La determinación de la bioquímica (glucosa, albúmina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (NEFA), urea, creatinina, aspartato aminotransferasa (ASAT), creatín quinasa (CK), gamma glutamil transferasa (GGT) y glutamato deshidrogenasa (GLDH)) se llevó a cabo empleando kits comerciales.

Los detalles de los métodos analíticos y del control de calidad analítica empleado durante todo el experimento aparecen descritos en extenso en el apartado de material y métodos.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa SPSS para Windows (v.14.0). La distribución normal de los datos se chequeó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. La influencia de la raza sobre los parámetros analizados a lo largo del periodo productivo se evaluó mediante un Modelo General Lineal (MGL) de medidas repetidas, donde la variable raza fue considerada como efecto principal fijo (diseño intersujetos) y los distintos muestreos (diseño intrasujetos) como medidas repetidas. La asociación entre la acumulación hepática de cobre y las enzimas marcadoras de daño hepático se evaluó empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

En la Tabla 1 aparecen reflejados los resultados de la hematología obtenidos en este estudio en terneros de raza Rubia gallega, Frisona y cruces de ambas razas, así como los resultados medios en la totalidad de los animales. Los resultados aparecen expresados como media aritmética \pm ES y rango de valores. Tanto los niveles de glóbulos rojos, como la concentración de hemoglobina y el hematocrito están dentro de los rangos de normalidad (glóbulos rojos: $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$; hemoglobina: 8-15 g/dl; hematocrito: 24-46%) descritos para ganado vacuno por Jain (1986). Únicamente de forma puntual algún animal presentó valores fuera de estos rangos. En los índices eritrocitarios se observó una mayor variación, si bien en la mayoría de los casos estaban dentro del rango fisiológico establecido por Jain (1986).

Los valores medios de los glóbulos blancos se encuentran dentro del rango fisiológico para la especie ($4-12 \times 10^3/\mu\text{l}$; Jain, 1986). Únicamente un 4,35% de los animales presentaron valores por encima de este rango. La concentración media de plaquetas se encuentra dentro de la normalidad ($110-800 \times 10^3/\mu\text{l}$; Jain, 1986), no existiendo ningún valor fuera de este rango a lo largo de todo el estudio.

La raza no ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre ninguno de los parámetros hematológicos estudiados, a excepción de la concentración de plaquetas ($F_{2,22}=5,109$; $p=0,015$). Al estudiar la evolución a lo largo del tiempo observamos variaciones estadísticamente significativas en todos los parámetros, a excepción de los glóbulos blancos. No obstante, cabe señalar que no se observó ninguna tendencia de variación en los parámetros hematológicos a lo largo del periodo de suplementación, ni con la edad, tratándose en la mayoría de los casos de variaciones aleatorias.

En la Tabla 2 aparecen reflejados los datos obtenidos en el estudio bioquímico. La concentración media de glucosa sérica fue superior al rango de 45-75 mg/dl descrito para la especie (Kaneko, 1997), de hecho un 98,5% de los animales presentó valores

que superaban el límite máximo establecido. Los niveles de albúmina fueron ligeramente superiores al rango de normalidad (3-3,48 g/dl; Kaneko, 1997) en la totalidad de los animales. De forma paralela un 53% de las muestras presentó valores medios de proteínas totales superiores al rango de normalidad descrito por Kaneko (1997): 6,74-7,46 g/dl. Si bien, teniendo en cuenta los rangos descritos por Jain (1986): 7-8,5 g/dl y Radostits et al. (2002): 5,7-8,1 g/dl, la mayoría de los animales presentaban valores dentro de la normalidad. En cuanto a los parámetros de metabolismo lipídico, observamos que la concentración media de colesterol se presentó por encima del rango considerado para la especie (80-120 mg/dl; Smith, 2002). De hecho, un 62,2% de las muestras superaron el rango máximo. De forma paralela la concentración media de triglicéridos se presentó fuera del rango descrito para la especie (0-14 mg/dl: Kaneko, 1997). Sin embargo, los ácidos grasos no esterificados (NEFA) se encontraron dentro del rango fisiológico descrito por Radostits et al. (2002): 0-0,6 mmol/l. Con respecto a los marcadores de funcionalidad renal, observamos que tanto los niveles medios de urea como los de creatinina se mantuvieron dentro de los rangos de normalidad (urea <30 mg/dl, creatinina <2 mg /dl; Kaneko, 1997; Smith, 2002).

Los parámetros bioquímicos fueron similares en todas las razas, por tanto no observamos diferencias significativas. Al valorar el efecto de la suplementación de cobre a lo largo del tiempo sobre los parámetros bioquímicos observamos variaciones estadísticamente significativas en todos ellos a excepción de los marcadores renales, si bien estas variaciones no presentaron una tendencia constante con el tiempo de suplementación o con la edad de los animales.

En relación a las enzimas hepáticas determinadas en este estudio (Tabla 3), en general las actividades enzimáticas se situaron dentro de los valores de referencia de nuestro laboratorio para terneros de este rango de edad (ASAT <80 UI/l; CK <100 UI/l; GGT <17 UI/l), y en el caso de la GLDH por debajo del rango descrito por Underwood y Suttle (2002): 12-51 UI/l. No se observó una correlación significativa entre los niveles de cobre en hígado y la actividad sérica de las enzimas, únicamente hubo una asociación casi significativa ($r=0,740$, $p=0,057$) con la actividad ASAT en los terneros de raza Rubia gallega.

A pesar de que la acumulación de cobre en hígado fue un 24% superior en los terneros de raza Frisona que los de raza Rubia gallega, estando los cruces de ambas razas en una posición intermedia no observamos diferencias significativas de las enzimas hepáticas en las diferentes razas. Tampoco la suplementación de cobre en los animales de nuestro estudio produjo variaciones significativas en las enzimas hepáticas a lo largo del tiempo; únicamente de forma puntual observamos un aumento significativo de la enzima CK en todos los animales entre los 3 y 4 meses de vida ($F_{6,7}=6,847$; $p=0,011$).

Discusión

Los resultados de la hematología obtenidos en este estudio indican que no se observaron signos de crisis hemolítica asociada a la acumulación de cobre a lo largo del tiempo en ninguna de las razas estudiadas, de hecho, todos los parámetros hematológicos se mantuvieron más o menos constantes y dentro de la normalidad. Esto es característico de la fase prehemolítica de acumulación crónica de cobre (Humann-Ziehank et al., 2001). La crisis hemolítica, y la consiguiente anemia, se produce cuando se satura el umbral de acumulación de cobre en hígado y el cobre es liberado al torrente sanguíneo. Durante la fase clínica de intoxicación por cobre el estudio hematológico pone de manifiesto un marcado descenso del número de glóbulos rojos, del valor hematocrito y de la hemoglobina asociado a la hemólisis masiva que puede afectar hasta el 75% de los eritrocitos. En esta situación, los glóbulos blancos estarán muy aumentados (2-3 órdenes de magnitud) con un incremento muy marcado del número de neutrófilos (Underwood y Suttle, 2002).

Se ha visto que incluso en animales a los que se les administraron dosis elevadas de cobre no se observaron alteraciones hematológicas. Así, Humann-Ziehank et al. (2001) no observaron signos clínicos ni laboratoriales de crisis hemolítica en ovejas con intoxicación subclínica de cobre que recibieron un suplemento de cobre cinco veces superior que los terneros de nuestro experimento (180 mg/kg). De hecho la crisis hemolítica aguda ha sido observada ocasionalmente en ovejas varias semanas después de suplementación con cantidades mucho más elevadas de cobre (Howell y Gopinath, 1977; Gooneratne et al., 1980; Zervas et al., 1990). En ganado vacuno, que es más resistente a la intoxicación crónica por cobre que el ganado ovino (Underwood y Suttle, 2002), es más difícil, aún, observar una anemia significativa asociada a la crisis hemolítica; incluso en casos de intoxicación de animales con concentraciones elevadas de cobre tanto en hígado como en riñón no fue observada (Jenkins e Hidioglou, 1989; Tremblay y Baird, 1990).

Existen pocos datos en la bibliografía acerca del efecto de la suplementación de cobre sobre parámetros bioquímicos de funcionalidad hepática y renal. Únicamente, Humann-Ziehank et al. (2001) en ovejas con intoxicación subclínica de cobre describieron variaciones, aunque dentro de la normalidad, en las proteínas totales y urea. De hecho, las variaciones patológicas se observaron únicamente en algunos casos en el curso clínico de la intoxicación por cobre. Tremblay y Baird (1990) observaron niveles de glucosa ligeramente por encima de la normalidad, niveles de albúmina ligeramente disminuidos y niveles de creatinina y urea indicativos de fallo renal en dos vacas Holstein que sufrieron intoxicación crónica de cobre y presentaban signos de crisis hemolítica. De forma similar, Bradley (1993) describe variaciones en estos parámetros en casos de intoxicación crónica en vacas lecheras que recibieron suplementos de cobre similares a los de nuestro estudio (37,5 mg/kg), pero durante

un periodo largo de tiempo (2 años). En contraste, cabe destacar que animales con intoxicación aguda y concentraciones hepáticas y renales de cobre muy elevados no presentaron alteraciones patológicas en estos parámetros (Auza et al., 1999).

En nuestro estudio no observamos un efecto claro de la suplementación de cobre en las tres razas estudiadas sobre estos parámetros bioquímicos. Coincidiendo con estudios anteriores (Trembay y Baird, 1990; Bradley, 1993; Humann-Ziehank et al., 2001) observamos variaciones en las proteínas y niveles de glucosa ligeramente aumentados. No obstante, al afectar a la mayoría de los animales (98,5%) a lo largo de todo el período de suplementación, parecería indicar una hiperglucemia asociada al estrés ocasionado por la toma de muestras.

El cobre juega un papel importante en el metabolismo lipídico, sin embargo el mecanismo por el cual el cobre afecta al mismo no está claro, aunque parece estar relacionado con su potencial reductor (Wakatsuki, 1995), hay hipótesis de que altas concentraciones de cobre en hígado regulan indirectamente la síntesis de colesterol porque disminuye la forma reducida de glutatión (GSH) y aumenta la forma oxidada (GSSG) (Engle et al., 2000a). La deficiencia de cobre causa hipercolesterolemia por incremento de la concentración hepática de glutatión reducido (Kim et al., 1992). Desde hace unos años se sabe que tanto en cerdos (Amer y Elliot, 1973) como en pollos (Pesti y Bakalli, 1996), la suplementación de cobre por encima de los requerimientos produce alteraciones en el metabolismo lipídico y en el colesterol. En rumiantes, existen indicios de que la suplementación de cobre a dosis fisiológicas puede también afectar al metabolismo lipídico (Engle et al., 2000a; Engle y Spears, 2000b, 2001), y se han observado diferencias raciales en los efectos del cobre sobre el colesterol (Engle y Spears, 2001). En terneros de raza Angus y cruces de Angus y Hereford se observó que la suplementación con dosis de cobre entre 20 y 40 mg/kg MS producía una disminución de los niveles séricos de colesterol (Engle y Spears, 2000b), sin embargo, en terneros Simmental la suplementación de cobre no afectaba a los niveles de colesterol (Engle y Spears, 2001), y en vacas de raza Frisona, al igual que ocurre en los terneros de nuestro estudio, producía un aumento de los niveles de colesterol (Engle et al., 2001). En nuestro trabajo las tres razas se comportan de forma similar, la suplementación de cobre hace que los niveles de colesterol y triglicéridos tiendan a ser elevados, mientras que los NEFA se mantienen en niveles normales, ésto nos indicaría que en ningún momento a lo largo de la suplementación con cobre se produjo lipólisis, ya que los niveles de los NEFA se mantuvieron dentro de los rangos fisiológicos.

El diagnóstico de intoxicación por cobre generalmente se basa en la evaluación de la concentración orgánica de cobre (hígado y riñón) y enzimas marcadoras de daño hepático (Auza et al., 1999; Bidewell et al., 2000). La determinación de estas enzimas marcadoras de daño hepático permite evaluar el grado de necrosis celular

una vez que los hepatocitos saturados de cobre sufren la lisis celular (Sutherland et al., 1992; Auza et al., 1999; Bidewell et al., 2000). Sin embargo, al igual que observamos en nuestro estudio, el nivel de actividad enzimática no está siempre correlacionado con el nivel de acumulación de cobre en hígado (Van der Schee et al., 1993; Sutherland et al., 1992; Auza et al., 1999; Weaver et al., 1999; López-Alonso et al., 2006). En la actualidad también se han utilizado estas enzimas como marcadores tempranos de acumulación crónica de cobre (Humann-Ziehank et al., 2001; Laven et al., 2004; López-Alonso et al., 2006), si bien los resultados no son coincidentes. De hecho, algunos estudios muestran que las actividades de las enzimas tan sólo se elevan al comienzo de la crisis hemolítica, por lo tanto no serían realmente técnicas diagnósticas válidas (Humann-Ziehank et al., 2001), mientras que otros autores como Underwood y Suttle (2002) y Laven et al. (2004) sugieren que valores marginales de GLDH (>12 UI/l) indican una posible intoxicación crónica por cobre, mientras que valores por encima del límite superior (>51 UI/l) claramente sugieren intoxicación por cobre. La sensibilidad diagnóstica de las diferentes enzimas es variable, así Humann-Ziehank et al. (2001) y Laven et al. (2004) sugieren que la GLDH es mucho más sensible que la ASAT y la GGT, y dentro de éstas, Ortolani (2003) sugiere que la GGT seguida de ASAT son los mejores marcadores de acumulación crónica de cobre durante la fase prehemolítica en ovejas.

En este estudio la suplementación de cobre a lo largo del tiempo en las tres razas tuvo efectos mínimos sobre los parámetros hematológicos y a nivel bioquímico afectó únicamente al metabolismo lipídico y del colesterol. No obstante, la acumulación hepática de cobre fue bastante elevada, de hecho un 89% de los terneros de raza Frisona, un 70% en los cruces industriales y un 40% en los terneros de raza Rubia gallega presentaban niveles hepáticos de cobre asociados con toxicidad en ganado vacuno (>150 mg/kg peso fresco; Perrin et al., 1990; Gummow, 1996), sin embargo no se observaron signos clínicos ni laboratoriales de acumulación crónica de cobre. En este estudio las enzimas marcadoras de daño hepático no son buenos indicadores de la acumulación hepática de cobre. No debemos olvidar que los signos y las manifestaciones de intoxicación por cobre no solo están relacionadas con la dosis, sino que también es muy importante el tiempo de administración (Bradley, 1993). Al respecto, Auza et al. (1999) en una revisión de casos clínicos de intoxicación por cobre en rumiantes, describen niveles de cobre en hígado que varían desde 65 a 2410 mg/kg, con un rango de dosis de cobre que provocaban intoxicación muy amplio. Teniendo esto en cuenta, es muy probable que los animales de nuestro estudio, que recibieron 35 mg Cu/kg MS, pudieran presentar signos clínicos y laboratoriales de acumulación orgánica de cobre si la suplementación se mantuviese por un periodo de tiempo más largo.

Tabla 1. Parámetros hematológicos en terneros de raza rubia gallega, frisona, cruces industriales de las mismas y en la totalidad de los animales a lo largo de todo el ciclo productivo. Los resultados aparecen expresados como media aritmética \pm error estándar y rango de valores.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,57 \pm 0,40 7,39-11,9	8,99 \pm 0,26 7,63-10,4	8,76 \pm 0,30 7,9-10,8	8,42 \pm 0,24 7,39-9,38	9,77 \pm 0,36 7,71-11,4	9,86 \pm 0,22 8,76-11,3	9,54 \pm 0,45 7,72-11,4
Hb (g/dL)	11,9 \pm 0,39 10,5-14,6	11,5 \pm 0,28 9,70-13,1	10,9 \pm 0,28 9,2-12,1	11,5 \pm 0,42 9,9-14,6	9,59 \pm 0,19 8,7-10,6	10,1 \pm 0,36 7,60-11,7	10,3 \pm 0,39 8,8-11,7
Hto (%)	39,2 \pm 1,37 31,1-46,6	36,7 \pm 0,90 30,5-41,3	37,8 \pm 0,90 33,9-43,8	37,7 \pm 1,21 34,7-47,5	38,9 \pm 0,33 37,2-40,2	38,3 \pm 1,24 30,9-43,3	37,1 \pm 0,78 34,2-40,1
VCM (fL)	41,1 \pm 0,65 38,7-46,2	40,9 \pm 0,77 38,0-46,6	43,3 \pm 0,85 38,9-48,9	44,8 \pm 1,02 40,4-51,8	40,5 \pm 1,7 32,8-51,1	39,0 \pm 1,40 31,3-45,2	39,5 \pm 2,0 34,6-48,2
HCM (pg)	12,6 \pm 0,38 11,4-14,9	12,8 \pm 0,32 11,2-14,8	12,6 \pm 0,37 10,4-14,2	13,6 \pm 0,31 12,6-15,9	14,5 \pm 0,45 11,7-16,7	15,4 \pm 0,43 12,9-17,9	14,3 \pm 0,34 12,6-15,7
CHCM (%)	30,6 \pm 0,56 28,4-34,2	31,4 \pm 0,33 29,5-34,1	29,1 \pm 0,48 25,8-31,2	30,5 \pm 0,44 28,6-32,9	23,9 \pm 0,56 20,8-28,6	24,6 \pm 0,26 23,6-26,0	24,5 \pm 0,27 23,3-25,7
GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,21 \pm 0,58 5,70-11,4	8,60 \pm 0,70 5,4-13,6	8,78 \pm 0,37 6,90-10,9	8,67 \pm 0,49 6,30-11,3	10,2 \pm 0,24 9,06-11,4	10,1 \pm 0,20 9,18-11,1	10,3 \pm 0,41 8,19-11,9
Pla μ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	391 \pm 30,4 241-531	399 \pm 30,1 232-585	379 \pm 36,0 106-525	427 \pm 21,5 247-495	354 \pm 12,2 274-408	318 \pm 20,1 236-466	326 \pm 11,5 274-363
Frisona							
GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,71 \pm 0,26 8,54-11,6	9,07 \pm 0,29 8,19-11,2	8,55 \pm 0,29 7,79-10,1	8,33 \pm 0,28 7,16-9,48	10,3 \pm 0,21 9,13-10,9	10,3 \pm 0,20 9,36-11,2	10,4 \pm 0,39 8,75-12,2
Hb (g/dL)	12,3 \pm 0,35 10,2-14,0	10,1 \pm 0,34 8,80-12,5	12,2 \pm 0,33 10,7-13,6	10,5 \pm 0,23 9,60-11,6	9,14 \pm 0,18 8,40-9,80	10,1 \pm 0,47 8,80-13,0	10,4 \pm 0,40 9,10-13,1
Hto (%)	39,0 \pm 1,39 32,3-48,8	36,5 \pm 1,37 32,4-47,4	35,7 \pm 1,02 32,1-41,3	35,8 \pm 0,82 32,8-39,3	37,3 \pm 0,95 33,4-40,9	38,8 \pm 1,11 33,3-44,3	37,0 \pm 0,97 32,6-40,2
VCM (fL)	40,1 \pm 0,76 34,7-42,9	40,2 \pm 0,89 35,2-45,8	42,1 \pm 0,77 38,9-46,5	43,1 \pm 0,91 40,2-48,0	36,4 \pm 1,5 32,3-43,3	37,6 \pm 1,30 31,7-45,4	35,8 \pm 0,70 32,9-38,5
HCM (pg)	12,7 \pm 0,40 10,9-14,7	11,5 \pm 0,46 9,8-14,4	14,3 \pm 0,34 13,1-15,5	12,7 \pm 0,33 11,5-14,8	13,6 \pm 0,41 11,4-15,9	14,6 \pm 0,40 13,2-16,3	13,7 \pm 0,43 11,8-15,9
CHCM (%)	31,7 \pm 0,99 27,1-37,2	28,9 \pm 0,97 25,4-36,5	33,8 \pm 0,28 32,5-34,9	29,5 \pm 0,27 28,4-30,9	21,8 \pm 0,43 19,2-23,5	24,2 \pm 0,76 20,1-27,3	23,8 \pm 0,44 20,9-25,3
GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11,8 \pm 1,18 6,5-19,9	9,5 \pm 0,90 5,3-14,8	8,8 \pm 0,66 5,4-12,2	9,8 \pm 0,82 5,4-14,6	10,0 \pm 0,39 8,19-12,1	9,8 \pm 0,21 9,08-11,1	9,9 \pm 0,25 9,08-11,1
Pla μ ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	350 \pm 25,2 237-508	359 \pm 20,8 253-468	400 \pm 18,3 305-468	407 \pm 19,2 319-518	325 \pm 13,5 262-375	327 \pm 16,3 216-412	358 \pm 14,9 290-412

Tabla 1. Parámetros hematológicos (Continuación).

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Cruces							
GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,8 \pm 0,30 7,84-10,6	9,34 \pm 0,27 7,78-10,6	9,13 \pm 0,27 7,55-10,3	8,72 \pm 0,24 7,16-9,56	9,41 \pm 0,46 7,42-12,2	9,42 \pm 0,39 7,58-11,8	9,84 \pm 0,25 8,71-11,2
Hb (g/dL)	11,5 \pm 0,27 10,1-12,7	12,3 \pm 0,17 11-12,9	11,9 \pm 0,33 10,3-13,5	11,8 \pm 0,22 11,0-12,9	8,79 \pm 0,23 8,00-9,90	10,8 \pm 0,48 8,10-13,1	9,20 \pm 0,37 7,50-10,6
Hto (%)	40,6 \pm 1,07 36,9-46,6	37,7 \pm 0,62 35,7-42,1	39,2 \pm 1,06 34,5-46,6	37,6 \pm 0,61 35,1-41,3	37,6 \pm 0,64 34,1-40,3	37,9 \pm 1,06 33,3-43,5	37,5 \pm 1,06 33,3-42,3
VCM (fL)	41,6 \pm 0,92 37,3-47,1	40,6 \pm 0,79 36,9-45,9	41,8 \pm 0,80 38,4-47,1	43,3 \pm 0,91 39,2-49,0	40,0 \pm 2,2 28,4-48,6	40,3 \pm 1,90 29,7-48,2	38,3 \pm 0,90 32,4-40,8
HCM (pg)	11,8 \pm 0,30 10,8-14,0	13,3 \pm 0,50 10,9-16,5	13,1 \pm 0,26 11,5-14,4	13,6 \pm 0,30 11,9-15,4	13,1 \pm 0,27 12,1-14,7	15,3 \pm 0,47 13,6-17,5	13,8 \pm 0,27 12,8-14,9
CHCM (%)	28,3 \pm 0,34 26,8-29,7	32,6 \pm 0,63 29,7-35,9	31,2 \pm 0,44 29,9-33,3	31,4 \pm 0,23 30,5-32,5	20,9 \pm 0,33 19,2-22,2	26,7 \pm 0,66 24,2-29,6	22,8 \pm 0,41 21,2-24,7
GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,9 \pm 1,05 4,8-15,2	8,32 \pm 0,77 5,2-12,9	9,68 \pm 0,86 5,4-14,4	9,1 \pm 0,85 4,9-14,5	10,7 \pm 0,28 9,72-12,5	10,4 \pm 0,23 9,3-11,7	10,4 \pm 0,25 9,16-11,2
Plaq ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	428 \pm 20,6 368-592	424 \pm 19,4 333-497	417 \pm 22,7 304-511	470 \pm 16,7 390-544	338 \pm 18,9 266-464	347 \pm 19,6 251-424	330 \pm 17,4 236-424
Total animales							
GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,69 \pm 0,18 7,39-11,9	9,13 \pm 0,15 7,63-11,2	8,82 \pm 0,17 7,55-10,8	8,49 \pm 0,14 7,16-9,6	9,81 \pm 0,21 7,42-12,2	9,86 \pm 0,17 7,58-11,8	9,94 \pm 0,21 7,72-12,2
Hb (g/dL)	11,9 \pm 0,20 10,1-14,6	11,3 \pm 0,23 8,80-13,1	11,6 \pm 0,20 9,20-13,6	11,3 \pm 0,20 9,60-14,6	9,19 \pm 0,13 8,00-10,6	10,3 \pm 0,25 7,60-13,1	9,94 \pm 0,24 7,50-13,0
Hto (%)	39,6 \pm 0,73 31,1-48,8	36,9 \pm 0,57 30,5-47,4	37,6 \pm 0,61 32,1-46,6	37,1 \pm 0,55 32,8-47,5	38,0 \pm 0,39 33,4-40,9	38,3 \pm 0,65 30,9-44,3	37,2 \pm 0,53 32,6-42,3
VCM (fL)	40,9 \pm 0,45 34,7-47,1	40,6 \pm 0,46 35,2-46,6	42,4 \pm 0,47 38,4-48,9	43,8 \pm 0,56 39,2-51,8	39,1 \pm 1,10 28,4-51,1	39,0 \pm 0,90 29,7-48,2	37,8 \pm 0,80 32,4-48,2
HCM (pg)	12,3 \pm 0,22 10,8-14,9	12,5 \pm 0,28 9,8-16,5	13,3 \pm 0,23 10,4-15,5	13,3 \pm 0,19 11,5-15,9	13,8 \pm 0,24 11,4-16,7	15,1 \pm 0,25 12,9-17,9	13,9 \pm 0,20 11,8-15,9
CHCM (%)	30,2 \pm 0,47 26,8-37,2	30,9 \pm 0,47 25,4-36,5	31,2 \pm 0,43 25,8-34,9	30,5 \pm 0,24 28,4-32,9	22,3 \pm 0,36 19,2-28,6	25,2 \pm 0,38 20,1-29,6	23,7 \pm 0,26 20,9-25,7
GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9,63 \pm 0,61 4,80-19,9	8,80 \pm 0,45 5,20-14,8	9,09 \pm 0,37 5,40-14,4	9,16 \pm 0,41 4,90-14,6	10,3 \pm 0,18 8,19-12,5	10,1 \pm 0,13 9,08-11,7	10,2 \pm 0,17 8,19-11,9
Plaq ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	389 \pm 15,4 237-592	394 \pm 14,4 232-585	398 \pm 15,6 106-525	435 \pm 11,9 247-544	340 \pm 8,70 262-464	330 \pm 10,7 216-466	338 \pm 8,83 236-424

GR: glóbulos rojos, Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media, GB: glóbulos blancos, Plaq: plaquetas. Rango normal (Jain, 1986): GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$): 5-10; Hb (g/dL): 8-15; Hto(%): 24-46; VCM(fL): 40-60; HCM (pg): 11-17; CHCM (%): 30-36; GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$): 4-12; Plaq ($\times 10^3/\mu\text{L}$): 110-800.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos en terneros de raza rubia gallega, frisona, cruces industriales de las mismas y en la totalidad de los animales a lo largo de todo el ciclo productivo. Los resultados aparecen expresados como media aritmética \pm error estándar y rango de valores.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
Glucosa (mg/dl)	79,4 \pm 3,40 63,4-98,9	98,4 \pm 2,09 86,6-108	103 \pm 3,11 86,5-126	73,1 \pm 1,48 62,3-83,7	98,0 \pm 1,08 92,5-104	108 \pm 2,8 92,5-119	96,6 \pm 1,20 93,2-102
Albúmina (g/dl)	4,11 \pm 0,01 4,07-4,20	4,12 \pm 0,02 3,96-4,25	4,09 \pm 0,02 4,02-4,21	4,10 \pm 0,03 4,00-4,36	4,12 \pm 0,02 4,02-4,21	4,26 \pm 0,05 4,11-4,67	4,11 \pm 0,02 4,07-4,21
Proteínas totales (g/dl)	6,55 \pm 0,12 6,17-7,33	8,97 \pm 0,41 7,03-11,4	7,45 \pm 0,31 6,49-10,2	6,65 \pm 0,09 6,10-7,13	8,25 \pm 0,33 6,68-9,49	9,03 \pm 0,46 6,69-11,9	8,35 \pm 0,27 7,45-9,64
Colesterol (mg/dl)	129 \pm 3,76 113-145	153 \pm 5,81 131-178	86,7 \pm 2,08 72,5-95,3	137 \pm 3,95 110-157	135 \pm 2,90 120-148	115 \pm 4,24 93,5-137	152 \pm 6,45 133-184
Triglicéridos (mg/dl)	53,6 \pm 3,46 45,1-75,8	61,9 \pm 1,49 53,8-69,3	63,1 \pm 1,20 56,4-68,7	57,5 \pm 1,78 47,3-68,1	60,3 \pm 1,98 51,3-70,1	67,5 \pm 2,90 56,8-91,1	54,0 \pm 1,56 50,7-62,4
NEFA (mmol/l)	0,53 \pm 0,02 0,48-0,67	0,46 \pm 0,02 0,36-0,52	0,46 \pm 0,01 0,39-0,53	0,45 \pm 0,01 0,37-0,52	0,47 \pm 0,01 0,41-0,53	0,46 \pm 0,01 0,38-0,53	0,46 \pm 0,03 0,39-0,57
Urea (mg/dl)	16,3 \pm 2,21 9,3-27,9	21,2 \pm 0,97 16,2-26,4	19,0 \pm 1,16 9,47-24	21,5 \pm 0,92 15,7-26,3	20,4 \pm 0,78 16,2-24,7	23,7 \pm 1,07 18,2-30,2	23,1 \pm 1,55 17,2-29,5
Creatinina (mg/dl)	1,17 \pm 0,07 0,94-1,50	1 \pm 0,050 0,84-1,30	0,93 \pm 0,03 0,69-1,11	0,99 \pm 0,04 0,73-1,23	0,94 \pm 0,04 0,78-1,16	0,97 \pm 0,04 0,75-1,24	0,61 \pm 0,13 0,1-0,94
Frisona							
Glucosa (mg/dl)	73,8 \pm 6,71 49,9-110	109 \pm 7,34 87,0-167	98,9 \pm 2,77 91,4-117	78,4 \pm 2,10 71,5-85,2	98,5 \pm 2,81 83,1-107	109 \pm 4,35 91,3-135	90,3 \pm 1,74 82,9-99,8
Albúmina (g/dl)	4,09 \pm 0,02 3,99-4,17	4,09 \pm 0,01 4,04-4,17	4,06 \pm 0,01 4,04-4,13	4,06 \pm 0,02 4,03-4,08	4,11 \pm 0,02 4,03-4,17	4,16 \pm 0,02 4,06-4,24	4,12 \pm 0,03 4,1-4,13
Proteínas totales (g/dl)	7,05 \pm 0,15 6,39-7,68	8,72 \pm 0,47 5,15-10,8	7,02 \pm 0,24 5,4-7,92	6,70 \pm 0,15 6,33-7,36	8,31 \pm 0,25 7,45-9,43	9,26 \pm 0,53 7,46-11,9	8,96 \pm 0,24 7,95-10,1
Colesterol (mg/dl)	123 \pm 2,88 113-134	136 \pm 9,29 89,9-196	73,9 \pm 3,24 59,2-87,1	123 \pm 3,80 108-133	132 \pm 4,10 117-145	107 \pm 3,91 83,3-119	140 \pm 3,68 125-157
Triglicéridos (mg/dl)	52,8 \pm 1,27 49,7-60,1	62,3 \pm 1,15 55,3-68,3	64,4 \pm 1,28 57-69,3	55,1 \pm 2,67 48,4-64,3	56,4 \pm 1,64 48,3-62,2	63,7 \pm 1,87 54,2-72,4	51,5 \pm 0,59 49,3-54,3
NEFA (mmol/l)	0,51 \pm 0,01 0,48-0,55	0,5 \pm 0,02 0,41-0,57	0,45 \pm 0,02 0,37-0,54	0,45 \pm 0,02 0,39-0,51	0,45 \pm 0,02 0,38-0,54	0,47 \pm 0,02 0,38-0,55	0,46 \pm 0,01 0,38-0,52
Urea (mg/dl)	11,9 \pm 1,20 8,13-16,3	19,5 \pm 1,29 13,8-26,2	21,2 \pm 1,30 15,1-26,8	19,9 \pm 1,53 15,1-24,8	20,6 \pm 1,02 16,4-24,5	19 \pm 0,86 15,3-23,4	21,4 \pm 1,10 16,9-27,2
Creatinina (mg/dl)	1,07 \pm 0,06 0,82-1,33	1,16 \pm 0,06 0,87-1,50	0,99 \pm 0,03 0,83-1,16	1,06 \pm 0,05 0,89-1,20	1,02 \pm 0,04 0,88-1,27	0,93 \pm 0,05 0,64-1,16	1,01 \pm 0,07 0,69-1,43

Tabla 2. Parámetros bioquímicos (Continuación).

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Cruces							
Glucosa (mg/dl)	94,9±5,39 74,1-112	97,3±5,11 72,7-125	103±2,36 93,0-117	76,5±1,54 70,8-84,1	99,2±4,06 75,4-117	103±2,38 89,6-113	93,9±1,97 83,7-100
Albúmina (g/dl)	4,09±0,01 4,05-4,14	4,13±0,02 4,06-4,21	4,07±0,02 4-4,16	4,07±0,01 4,02-4,12	4,10±0,02 4,03-4,19	4,15±0,01 4,08-4,22	4,12±0,02 4,03-4,22
Proteínas totales (g/dl)	6,7±0,192 5,72-7,46	9,59±0,30 8,54-11,2	7,14±0,08 6,8-7,53	7,15±0,13 6,48-7,63	7,81±0,24 6,56-9,27	8,87±0,58 6,44-11,5	8,56±0,19 8,04-9,54
Colesterol (mg/dl)	134±3,58 116-148	155±6,08 132-187	85,7±2,44 71,2-94,0	128±5,96 100-152	128±3,68 110-145	120±9,58 87,3-193	146±4,65 128-176
Triglicéridos (mg/dl)	55,7±1,69 49,3-63,3	67±2,36 58,3-76,4	61±1,92 52,2-67,6	55,6±1,70 51,1-64,2	59,3±2,28 49,1-70,2	60,2±1,49 52,6-69,3	55,7±3,37 49,3-79,6
NEFA (mmol/l)	0,51±0,01 0,48-0,52	0,46±0,02 0,36-0,53	0,45±0,02 0,36-0,51	0,44±0,02 0,36-0,51	0,47±0,02 0,38-0,55	0,44±0,02 0,33-0,53	0,48±0,02 0,41-0,54
Urea (mg/dl)	16,8-1,86 8,13-23,3	16,6-1,65 9,35-23,3	20,70,67 17,6-23,5	21,60,78 18,7-24,7	21,3-0,89 17,3-27,5	22-0,77 18,05-25	21,8-1,21 16,08-27
Creatinina (mg/dl)	1,10±0,07 0,88-1,41	1,11±0,07 0,83-1,42	1,00±0,05 0,73-1,23	0,97±0,07 0,64-1,23	0,98±0,05 0,75-1,20	1,04±0,06 0,75-1,26	1,00±0,06 0,74-1,38
Total animales							
Glucosa (mg/dl)	82,6±3,39 49,9-112	102±3,13 72,7-167	102±1,62 86,5-126	75,5±1,02 62,3-85,2	98,6±1,64 75,43-117	108±1,84 89,62-135	93,4±1,09 82,9-102
Albúmina (g/dl)	4,10±0,01 3,99-4,20	4,11±0,01 3,96-4,25	4,08±0,01 4,00-4,21	4,08±0,01 4,00-4,36	4,11±0,01 4,02-4,21	4,20±0,02 4,06-4,67	4,11±0,01 4,03-4,22
Proteínas totales (g/dl)	6,76±0,10 5,72-7,68	9,08±0,24 5,15-11,4	7,22±0,14 5,40-10,2	6,82±0,08 6,10-7,63	8,11±0,16 6,56-9,49	9,05±0,30 6,44-11,9	8,65±0,14 7,45-10,1
Colesterol (mg/dl)	128±2,10 113-148	148±4,39 89,9-196	82,4±1,79 59,2-95,3	131±2,91 100-157	131±2,06 110-148	114±3,73 83,3-193	145±2,84 125-184
Triglicéridos (mg/dl)	54±1,38 45,1-75,8	63,6±1,04 53,8-76,4	62,9±0,86 52,2-69,3	56,3±1,12 47,3-68,1	58,8±1,17 48,3-70,2	63,9±1,38 52,6-91,1	53,7±1,31 49,3-79,6
NEFA (mmol/l)	0,51±0,01 0,48-0,67	0,47±0,01 0,36-0,57	0,45±0,01 0,36-0,54	0,45±0,01 0,36-0,52	0,46±0,01 0,38-0,55	0,46±0,01 0,33-0,55	0,47±0,01 0,38-0,57
Urea (mg/dl)	15,1±1,11 8,13-27,9	19,2±0,81 9,35-26,4	20,2±0,64 9,47-26,8	21,2±0,59 15,1-26,3	20,8±0,50 16,2-27,5	21,7±0,63 15,3-30,2	22,1±0,72 16,1-29,5
Creatinina (mg/dl)	1,11±0,04 0,82-1,50	1,09±0,04 0,83-1,50	0,97±0,02 0,69-1,23	0,10±0,03 0,64-1,23	0,98±0,03 0,75-1,27	0,98±0,03 0,64-1,26	0,90±0,06 0,1-1,43

Rango normal (Kaneko, 1997): glucosa (mg/dl): 45-75; Albúmina (g/dl): 3-3.6; Proteínas totales (g/dl): 6.7-7.5; Colesterol (mg/dl): 80-120; Triglicéridos (mg/dl): 0-14; NEFA (mmol/l): 0-0.6; Urea (mg/dl): 20-30; Creatinina (mg/dl): 1-2.

Tabla 3. Enzimas marcadoras de daño hepático en terneros de raza rubia gallega, frisona, cruces industriales de las mismas y en la totalidad de los animales a lo largo de todo el ciclo productivo. Los resultados aparecen expresados como media aritmética \pm error estándar y rango de valores.

	Edad (meses)						
	3	4	5	6	7	8	9
Rubia gallega							
ASAT (UI/l)	25,6 \pm 2,15 14,5-34,9	25,7 \pm 1,95 18,2-33,8	23,1 \pm 1,35 16,3-30,4	23,5 \pm 1,48 15,4-30,1	25,7 \pm 1,31 19,4-31,0	25,6 \pm 1,40 16,6-32,2	28,9 \pm 1,26 23,4-34,3
CK (UI/l)	23,4 \pm 4,32 3,37-40,5	45,8 \pm 2,91 30,6-64,4	57 \pm 2,23 44,2-67,4	57,4 \pm 2,91 43,2-73,2	57,7 \pm 3,44 41,1-73,8	61,9 \pm 3,55 45,4-87,2	54,8 \pm 4,46 39,3-70,1
GGT (UI/l)	6,54 \pm 0,48 4,23-9,23	6,89 \pm 0,58 4,87-10,4	6,12 \pm 0,28 4,28-7,39	6,09 \pm 0,32 4,33-8,13	6,31 \pm 0,40 4,32-9,16	5,77 \pm 0,36 4,32-8,37	5,65 \pm 0,77 3,20-9,33
GLDH (UI/l)	5,23 \pm 0,43 3,12-7,22	5,99 \pm 0,42 4,09-8,23	6,27 \pm 0,35 5,18-9,23	6,27 \pm 0,20 5,26-7,23	5,28 \pm 0,30 4,29-7,18	5,72 \pm 0,43 4,3-9,11	5,69 \pm 0,36 4,33-7,14
Frisona							
ASAT (UI/l)	24,1 \pm 5,06 9,88-52,9	31,2 \pm 3,22 18,3-52,0	22,3 \pm 1,10 17,7-26,5	27,5 \pm 1,57 20,2-31,1	23,6 \pm 1,89 18,1-32,5	29,5 \pm 2,48 18,7-40,2	27,8 \pm 2,52 19,1-43,1
CK (UI/l)	32,5 \pm 12,8 11,2-120	56,2 \pm 6,85 39,3-115	60,8 \pm 3,00 43,4-73,3	61,7 \pm 3,22 47,2-70,2	66,7 \pm 7,49 40,2-105	58,8 \pm 6,52 43,3-108	60,5 \pm 7,45 44,3-118
GGT (UI/l)	7,16 \pm 0,65 4,4-10,2	7,15 \pm 0,38 5,25-9,23	5,65 \pm 0,27 4,34-6,77	6,93 \pm 0,48 5,68-9,15	6,24 \pm 0,42 4,33-8,27	6,22 \pm 0,43 4,72-9,25	6,84 \pm 0,59 4,22-9,28
GLDH (UI/l)	5,87 \pm 0,33 4,26-7,04	6,79 \pm 0,28 5,27-8,11	6,21 \pm 0,25 5,04-7,38	7,29 \pm 0,48 6,05-9,13	5,64 \pm 0,46 4,37-8,42	6,34 \pm 0,56 4,23-9,24	6,15 \pm 0,28 4,79-7,27
Cruces							
ASAT (UI/l)	30,6 \pm 3,13 12,8-43,0	26,7 \pm 1,54 18,6-33,2	24,5 \pm 1,12 19,2-28,4	24,2 \pm 1,11 19,7-28,3	25,7 \pm 1,45 17,5-33,3	24,1 \pm 1,60 17,3-33,6	24,4 \pm 1,82 15,1-31,4
CK (UI/l)	19,4 \pm 3,61 6,70-36,0	46,6 \pm 3,95 27,6-70,2	63,5 \pm 2,86 53,3-77,7	61,8 \pm 2,26 53,2-71,0	56,7 \pm 2,77 42,4-73,2	58,6 \pm 2,61 46,2-73,3	51,3 \pm 2,03 41,5-61,1
GGT (UI/l)	6,99 \pm 0,49 5,25-9,05	5,72 \pm 0,33 4,18-7,13	6,13 \pm 0,27 4,32-7,23	5,83 \pm 0,30 4,29-7,16	6,22 \pm 0,32 4,18-7,33	6,43 \pm 0,25 5,42-8,31	6,41 \pm 0,36 4,76-8,26
GLDH (UI/l)	6,14 \pm 0,28 4,32-7,12	6,22 \pm 0,38 4,26-8,05	6,48 \pm 0,26 5,13-8,12	6,22 \pm 0,30 4,72-7,19	5,84 \pm 0,45 4,37-9,00	6,12 \pm 0,28 4,23-7,19	6,70 \pm 0,41 5,16-9,12
Total animales							
ASAT (UI/l)	26,7 \pm 2,04 9,88-52,9	28 \pm 1,43 18,2-52,0	23,3 \pm 0,70 16,3-30,5	24,7 \pm 0,87 15,4-31,1	25,1 \pm 0,87 17,5-33,3	26,3 \pm 1,09 16,6-40,2	26,9 \pm 1,19 15,1-43,1
CK (UI/l)	25,0 \pm 4,47 3,37-120	49,6 \pm 2,89 27,6-115	60,2 \pm 1,57 43,4-77,7	59,9 \pm 1,66 43,2-73,2	59,9 \pm 2,68 40,2-105	59,9 \pm 2,43 43,3-108	55,6 \pm 3,03 39,3-118
GGT (UI/l)	6,90 \pm 0,30 4,23-10,2	6,60 \pm 0,28 4,18-10,4	6,00 \pm 0,16 4,28-7,39	6,21 \pm 0,21 4,29-9,15	6,25 \pm 0,21 4,18-9,16	6,12 \pm 0,20 4,32-9,25	6,35 \pm 0,33 3,2-9,33
GLDH (UI/l)	5,72 \pm 0,21 3,12-7,22	6,33 \pm 0,21 4,09-8,23	6,32 \pm 0,17 5,04-9,23	6,50 \pm 0,19 4,72-9,13	5,58 \pm 0,23 4,29-9,00	6,04 \pm 0,24 4,23-9,24	6,22 \pm 0,21 4,33-9,12

ASAT: aspartato aminotransferasa; CK: creatín quinasa; GGT: gamma glutamil transferasa; GLDH: glutamato deshidrogenasa. Rango normal en nuestro laboratorio: ASAT (UI/l): <80, CK (UI/l): <100, GGT: <17. Rango normalidad GLDH (UI/l): 12-51 (Underwood y Suttle, 2002).

Conclusiones

- Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que la suplementación de cobre en terneros al nivel máximo que permite la legislación europea (35 mg/kg materia seca) durante todo el ciclo productivo (crecimiento y cebo) desencadena concentraciones de cobre en hígado por encima de los niveles fisiológicos para esta especie animal. Los terneros de raza Frisona presentan una acumulación total de cobre a nivel hepático significativamente superior a los de raza Rubia gallega (61%) y a los cruces de ambas razas (23%). La raza Frisona es además la que presenta un mayor porcentaje de animales (89%) con niveles hepáticos de cobre asociados con toxicidad (>150 mg/kg peso fresco), frente al 70% en los cruces industriales y al 40% en los terneros de raza Rubia gallega.
- A diferencia de lo que ocurre en el hígado, las concentraciones de cobre en el resto de los tejidos analizados son bajas en los tres grupos raciales considerados, y se sitúan en todos los casos dentro de los valores fisiológicos para esta especie animal. Los terneros de raza Rubia gallega presentan concentraciones de cobre superiores a los de raza Frisona en todos los tejidos, a excepción del cerebro, ocupando los cruces industriales una posición intermedia entre ambas razas; no obstante en ningún caso las diferencias entre razas alcanzan significación estadística.
- A nivel sanguíneo, los terneros de raza Rubia gallega presentan en general durante todo el ciclo productivo niveles de cobre en sangre, cobre en suero y actividad ceruloplasmina superiores a los de raza Frisona, ocupando los cruces una posición intermedia entre ambas razas, si bien en ningún caso las diferencias entre razas alcanzan significación estadística.

Los mayores niveles de cobre en suero y sangre y actividad ceruloplasmina en terneros de raza Rubia gallega, junto con una mayor concentración de cobre extrahepático en todos los tejidos analizados, en comparación con los terneros de raza Frisona, podrían indicar que las diferencias en la acumulación de cobre a nivel hepático entre ambas razas puedan deberse, al menos en parte, a una distinta capacidad de redistribución del cobre hepático hacia los tejidos, fundamentalmente en forma de ceruloplasmina.

- Al evaluar la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos observamos que no existen diferencias raciales estadísticamente significativas, si bien encontramos una tendencia o patrón de distribución similar en los distintos lóbulos hepáticos para las tres razas consideradas: las mayores concentraciones de cobre se situaron siempre en el lóbulo izquierdo, seguido de la apófisis papilar, mientras que los menores niveles de cobre se describen en los lóbulos caudado y cuadrado. Estas diferencias de acumulación de cobre podrían estar justificadas por una diferencia en el flujo sanguíneo y capacidad de drenaje biliar.

El hecho de que en el lóbulo izquierdo a partir de una concentración de cobre de aproximadamente 200 mg/kg peso fresco se alcance una fase de meseta, sugiere que a partir de esta concentración el patrón de acumulación podría cambiar dando lugar a un mayor acúmulo de cobre en otras localizaciones.

- Al evaluar la acumulación de cobre en el hígado a nivel subcelular, no encontramos diferencias raciales estadísticamente significativas en las concentraciones de metalotioneínas ni en el cobre unido a las mismas. En todos los animales de nuestro estudio la concentración de metalotioneínas no está relacionada con la concentración total de cobre, aunque si es altamente dependiente del estatus de zinc del animal; además, la capacidad del cobre para unirse a las metalotioneínas es función de la concentración de las mismas en la célula hepática.

La distribución de cobre en los distintos compartimentos subcelulares (núcleo, grandes organelas, microsomas y citosol) tampoco mostró diferencias significativas entre las razas estudiadas. Así, en los tres grupos, la mayor proporción de cobre se encuentra en la fracción granular, seguida del citosol y núcleo, mientras que en la fracción microsomal el contenido de cobre es muy bajo.

- La determinación de la concentración de cobre en biopsias hepáticas *in vivo* es un procedimiento adecuado para evaluar la acumulación hepática de cobre en ganado vacuno en las condiciones de este estudio.
- La suplementación de cobre durante todo el ciclo productivo en las tres razas estudiadas no mostró una influencia significativa sobre los parámetros hematológicos. A nivel bioquímico la suplementación de cobre da lugar a niveles altos de colesterol y triglicéridos en suero. Las enzimas marcadoras de daño hepático no son buenas predictoras de la acumulación hepática de cobre en los animales de este estudio.

Conclusioni

- I risultati del nostro studio indicano che i livelli di rame consentiti dalla legislazione europea nei vitelli (35 mg/kg S.S.) durante tutto il ciclo produttivo (accrescimento ed ingrasso) raggiungono concentrazioni nel fegato superiori ai valori fisiologici. I vitelli di razza frisona presentano un accumulo totale di rame a livello epatico significativamente superiore a quelli di razza Rubia gallega (61%) ed agli incroci industriali delle due razze (23%). Tra tutta la specie bovina, la razza Frisona é quella che presenta una maggiore percentuale di animali (89%) con livelli epatici di rame tossici (>150 mg/kg P.V), contro il 70% degli incroci industriali ed il 40% nei vitelli di razza Rubia gallega.
- A differenza di quanto avviene nel fegato, le concentrazioni di rame nel resto dei tessuti analizzati risultano essere basse per tutte e tre le razze considerate, e rientrano nei valori fisiologici propri di questa specie animale. I vitelli di razza Rubia gallega presentano concentrazioni di rame superiori a quelli di razza Frisona in tutti i tessuti, eccetto nel cervello; mentre gli incroci industriali hanno una posizione intermedia tra le due. Tuttavia in nessun caso questa differenza razziale raggiunge un significato importante a livello statistico.
- A livello sanguigno, i vitelli di razza Rubia gallega presentano, in generale, durante tutto il ciclo riproduttivo, livelli di rame nel sangue, nel siero ed un'attività della ceruloplasmina, superiori a quelli della razza Frisona; mentre gli incroci industriali occupano una posizione intermedia tra le due razze, ma senza nessuna rilevanza significativa a livello statistico.

I Maggiori livelli di rame nel siero e nel sangue e l'attività della ceruloplasmina nei vitelli della razza Rubia gallega, insieme ad una maggiore concentrazione di rame in tutti i tessuti analizzati, ed in comparazione con i vitelli della razza Frisona, potrebbero indicare che le differenze di accumulo di rame a livello epatico tra le due razze siano dovute, almeno in parte, ad una diversa capacità di distribuzione del rame epatico verso i tessuti, fondamentalmente in forma di ceruloplasmina.

- Nel valutare l'accumulo di rame nei diversi lobi epatici abbiamo osservato che non esistono differenze razziali statisticamente significative; infatti si é riscontrata una tendenza o modello di distribuzione simile nei diversi lobi

epatici per tutti e tre i gruppi di animali considerati. La maggior concentrazione di rame si riscontra sempre nel lobo sinistro, seguito dalla apofisi papilar; i livelli minori invece si riscontrano nel lobo caudato e quadrato. Queste differenze di accumulo del rame potrebbero essere giustificate per la diversa irrorazione sanguigna e per il diverso drenaggio biliare che presentano i vari lobi.

Il fatto che nel lobo sinistro, partendo da una concentrazione di rame approssimativamente di 200 mg/kg P.V. si raggiunga una fase di plateau, suggerisce che durante questa fase il modello di accumulo di rame potrebbe cambiare dando luogo ad un maggior accumulo nelle altre zone.

- Nel valutare l'accumulo di rame nel fegato a livello subcellulare, non abbiamo riscontrato differenze razziali statisticamente significative né per quanto riguarda la concentrazione della metallotioneína né per la stessa unita al rame. In tutti gli animali del nostro studio la concentrazione di metallotioneína non é relazionata con la concentrazione totale di rame, anche se é altamente dipendente dallo status dello zinco dell'animale; inoltre, la capacità del rame ad unirsi alla metallotioneína é in funzione della concentrazione della stessa nella cellula epatica.

Neanche la distribuzione del rame nei diversi compartimenti cellulari (nucleo, organuli, microsoma e citosol) ha mostrato differenze significative tra le razze studiate. La maggior quantità si é riscontrata nella frazione granulare, seguita dal citosol e nucleo; mentre nella frazione microsomale la quantità di rame é molto bassa.

- Per questo studio, la biopsia epatica risulta essere il procedimento piú adeguato per determinare l'accumulo di rame a livello epatico, nel bestiame bovino.
- L'aggiunta di rame, in dose di 35 mg/kg di S.S., durante la fase di accrescimento-ingrasso nelle tre razze studiate, ha causato effetti minimi sui parametri ematologici ed a livello biochimico ha modificato solo il metabolismo dei lipidi e del colesterolo, innalzando i livelli di colesterolo e trigliceridi nel siero. Infine gli enzima marker di danno epatico non forniscono risultati attendibili per l'accumulo epatico di rame.

Conclusions

- The results of our study showed that when calves received the maximum supply of copper allowed by the European Legislation (35 mg/kg dry matter) during the whole cycle (growth and fattening) led to concentrations of copper in liver over the standard physiological levels for these breeds. The Holstein Friesian calves presented a total accumulation of copper at hepatic level significantly higher than those of Galician blonde (61 %) and to the commercial cross-breed (23 %). The Holstein Friesian breed also showed the higher animal percentage (89 %) with toxicity at the hepatic level related to copper, followed by the commercial crossing (70 %) and the calves of Galician blonde breed (40%).
- On the contrary to what had happened in the liver, the concentrations of copper in the rest of the analyzed tissues are low on the three groups, and the copper concentrations in all the samples maintained the standard physiological values for these breeds. In all the tissues, with the exception of the brain, the Galician blonde calves breed presented higher concentrations of copper compared to Holstein Friesian breed. The commercial crossing breed occupied a intermediate position between both breeds; nevertheless, there was not a statistical significant difference between breeds.
- At blood level, the calves of Galician blonde breed broadly presented during the experiment the higher levels of copper in blood, copper in serum and activity of ceruloplasmin than those of Holstein Friesian breed. The commercial crossing breed kept a median position between both breeds, although did not find statistical significant differences between all breeds.

Higher levels of copper in serum, blood, ceruloplasmin activity and the higher concentration of extra-hepatic copper in all the analyzed tissues in the Galician blonde calves compared to the Holstein Friesian calves breed. These differences among the accumulation of copper at hepatic level between both breeds might indicate a different ability of these two breeds to relocate the hepatic copper towards the tissues, fundamentally in the ceruloplasmin type.

- When we evaluated the accumulation of copper in the different hepatic lobes, we observed that there were not any statistically significant differences between copper concentrations in the three breeds, although we found a predisposition or

pattern of similar distribution in the different hepatic lobes for the three considered breeds: The higher concentrations of copper were always located in the lobus dexter, followed by the processus papillaris, whereas the lower levels of copper are described in the lobus caudatus and lobus quadratus. These accumulation differences of copper might be related to differences in the blood flow and on more limited bile excretion capacity.

We observed a plateau of copper concentration at approximately (200 mg/kg w.wt.) in the lobus dexter. This result might indicate that the copper accumulation pattern at this point might change displacing the copper concentration to other location.

- When we measured the accumulation of copper in the liver at a sub-cellular level, we did not find significant breed differences neither in the metallothioneins concentrations nor in the copper bound to them. In all the animals of our study, the metallothioneins concentration is not related to the total copper concentration, although metallothioneins concentration is highly dependent on the zinc status in the animals. The copper capacity to bind to the metallothioneins is a function of the metallothioneins concentration in the hepatic cells. The copper distribution in the different sub-cellular compartments (nucleus, big organelles, microsomes and cytosol) did not show either statistical significant difference between the considered breeds. Consequently, in the three groups, the higher copper proportion is located in the granular fraction, followed by the cytosol and nucleus, whereas in the microsomal fraction the content of copper is very low.
- The determination of the copper concentration done using hepatic biopsies (pre-mortem) is a satisfactory procedure to evaluate the hepatic copper accumulation in beef cattle within this study conditions.
- The copper supply throughout the whole cycle in the three studied breeds did not show a significant variation on the hematology parameters. At a biochemical level, the copper supply led to high levels of cholesterol and triglycerides in serum. And, in relation to the marker enzymes (AST, GGT, GLDH, CK) that showed hepatic damage did not predict the copper hepatic accumulation in the animals of this study.

Resumen

Dentro de las especies animales existen importantes diferencias en su susceptibilidad a padecer procesos tanto de intoxicación como de deficiencia por cobre; así, los rumiantes son más susceptibles al cobre que las especies monogástricas. Consecuentemente al hallazgo de estas diferencias entre especies, la raza se convirtió en un factor de creciente interés dentro del estudio del metabolismo del cobre, principalmente en la especie ovina, donde se logró clasificar las distintas razas en resistentes o susceptibles a padecer intoxicación por dicho metal. En ganado vacuno, sin embargo, la importancia del componente racial en el metabolismo del cobre apenas se ha estudiado y poco se conoce sobre la posible susceptibilidad a la intoxicación que presentan las diferentes razas.

Estudios de campo llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación sobre terneros expuestos de forma natural a altos niveles de cobre en pastos abonados reiteradamente con purines de cerdos ricos en cobre, ponen de manifiesto que existen diferencias raciales en la acumulación de cobre a nivel hepático, no obstante son necesarios más estudios experimentales para avalar estos hallazgos.

El objetivo general que nos planteamos en esta Tesis Doctoral fue evaluar de forma experimental la influencia de la raza (Rubia Gallega, Frisona, y cruces industriales de ambas razas) sobre el metabolismo y la acumulación intrahepática de cobre en terneros mantenidos en régimen intensivo y con el nivel de suplementación permitido por la Unión Europea (35 mg/kg materia seca; Reglamento CE Nº 1334/2003 de la Comisión de 25 de julio de 2003). Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos: 1) Evaluar el efecto de la raza sobre diversos parámetros sanguíneos de cobre durante todo el ciclo productivo en terneros; 2) Estudiar la existencia de diferencias raciales en la distribución y acumulación orgánica (hígado, riñón, músculo, corazón, bazo y cerebro) de cobre en el momento del sacrificio; 3) Determinar la existencia de diferencias raciales sobre la distribución del cobre en distintas regiones anatómicas del hígado, así como la validez de la biopsia hepática in vivo para determinar la acumulación intrahepática de cobre; 4) Valorar la influencia de la raza en la distribución subcelular de cobre en hígado (fraccionamiento subcelular y concentración de metalotioneínas) y su posible condicionamiento en la susceptibilidad de los animales a sufrir procesos de acumulación crónica y 5) Evaluar

las repercusiones orgánicas de la acumulación orgánica de cobre, a través de parámetros hematológicos y bioquímicos en las distintas razas.

Para este estudio se utilizaron 30 terneros de las razas Rubia gallega (n=11), Frisona (n=9) y cruces industriales entre ambas (n=10) que fueron mantenidos en condiciones de experimentación desde los tres meses de edad hasta el momento del sacrificio (9-10 meses de edad). Los animales fueron divididos en tres grupos o lotes determinados por las razas y recibieron una dieta comercial para crecimiento y engorde con una suplementación de 35 mg de cobre por kg MS. Se tomaron muestras de sangre mensualmente durante todo el ciclo productivo. Una vez sacrificados los animales se tomaron muestras de hígado, riñón, cerebro, corazón, bazo y músculos. Se realizaron también biopsias hepáticas de todos los animales en el momento previo al sacrificio. Las muestras de sangre entera y tejidos se sometieron a una digestión ácida en microondas y posteriormente los niveles de cobre se determinaron por ICP-OES. La actividad de ceruloplasmina en suero se llevó a cabo empleando la técnica de p-fenilenediamina. La concentración de metalotioneínas en hígado (lóbulo caudado), riñón y cerebro se determinó empleando una técnica de saturación por plata. Los valores hematológicos fueron determinados mediante un contador hematológico y las variables bioquímicas mediante kits comerciales.

Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que con los niveles de suplementación de cobre que permite la legislación europea en terneros (35 mg/kg materia seca) durante todo el ciclo productivo (crecimiento y cebo) se alcanzan concentraciones de cobre en hígado por encima de los niveles fisiológicos. Los terneros de raza Frisona presentan una acumulación total de cobre a nivel hepático significativamente superior a los de raza Rubia gallega (61%) y a los cruces de ambas razas (23%). La raza Frisona es además la que presenta un mayor porcentaje de animales (89%) con niveles hepáticos de cobre asociados con toxicidad en ganado vacuno (>150 mg/kg peso fresco), frente al 70% en los cruces industriales y al 40% en los terneros de raza Rubia Gallega.

A diferencia de lo que ocurre en el hígado, las concentraciones de cobre en el resto de los tejidos analizados son bajas en los tres grupos raciales considerados, y se sitúan en todos los casos dentro de los valores fisiológicos para esta especie animal. Los terneros de raza Rubia gallega presentan concentraciones de cobre superiores a los de raza Frisona en todos los tejidos, a excepción del cerebro, ocupando los cruces industriales una posición intermedia entre ambas razas; no obstante en ningún caso las diferencias entre razas encontradas alcanzan significación estadística.

A nivel sanguíneo, los terneros de raza Rubia gallega presentan en general durante todo el ciclo productivo niveles de cobre en sangre, cobre en suero y actividad ceruloplasmina superiores a los de raza Frisona, ocupando los cruces industriales una

posición intermedia entre ambas razas, pero sin ningún efecto estadístico significativo .

Los mayores niveles de cobre en suero y sangre y actividad ceruloplasmina en terneros de raza Rubia gallega, junto con una mayor concentración de cobre en todos los tejidos analizados, en comparación con los terneros de raza Frisona, podrían indicar que las diferencias en la acumulación de cobre a nivel hepático entre ambas razas puedan deberse, al menos en parte, a una distinta capacidad de redistribución del cobre hepático hacia los tejidos, fundamentalmente en forma de ceruloplasmina.

Al evaluar la acumulación de cobre en los distintos lóbulos hepáticos observamos que no existen diferencias raciales estadísticamente significativas, si bien encontramos una tendencia o patrón de distribución similar en los distintos lóbulos hepáticos para los tres grupos de animales considerados: las mayores concentraciones de cobre se situaron siempre en el lóbulo izquierdo, seguido de la apófisis papilar, mientras que los menores niveles de cobre se describen en los lóbulos caudado y cuadrado. Estas diferencias de acumulación de cobre podrían estar justificadas por una diferencia en el flujo sanguíneo y capacidad de drenaje biliar.

El hecho de que en el lóbulo izquierdo a partir de una concentración de cobre de aproximadamente 200 mg/kg peso fresco se alcance una fase de meseta, sugiere que a partir de esa concentración el patrón de acumulación de cobre a nivel hepático podría cambiar dando lugar a un mayor acúmulo en otras localizaciones.

Al evaluar la acumulación de cobre en el hígado a nivel subcelular, no encontramos diferencias raciales estadísticamente significativas en las concentraciones de metalotioneínas ni en el cobre unido a las mismas. En todos los animales de nuestro estudio la concentración de metalotioneínas no está relacionada con la concentración total de cobre aunque si es altamente dependiente del estatus de zinc del animal; además, la capacidad del cobre para unirse a las metalotioneínas es función de la concentración de las mismas en la célula hepática.

La distribución de cobre en los distintos compartimentos subcelulares (núcleo, grandes organelas, microsomas y citosol) tampoco mostró diferencias significativas entre las razas estudiadas. Así, para todos los grupos raciales considerados, la mayor proporción de cobre se encuentra en la fracción granular, seguida del citosol y núcleo, mientras que en la fracción microsomal el contenido de cobre es muy bajo.

La determinación de la concentración de cobre en biopsias hepáticas *in vivo* es un procedimiento adecuado para la determinación de la acumulación de cobre a nivel hepático en ganado vacuno en las condiciones de este estudio.

La suplementación de cobre durante todo el ciclo productivo en las tres razas estudiadas no mostró una influencia significativa sobre los parámetros hematológicos. A nivel bioquímico la suplementación de cobre da lugar a niveles

altos de colesterol y triglicéridos en suero. Las enzimas marcadoras de daño hepático no son buenas predictoras de la acumulación hepática de cobre en los animales de este estudio.

Riassunto

All'interno della specie animale e specificatamente fra gli animali domestici, esistono importanti differenze sulla loro predisposizione a sopportare processi tanto di intossicazione come di deficienza del rame; i ruminanti, ad esempio, sono più suscettibili al rame dei monogastries.

Conseguentemente alla scoperta di queste differenze, la specie ruminante, col tempo, si é trasformata in un fattore di crescente interesse per lo studio del metabolismo del rame. Soprattutto, nella specie ovina, dove é stata fatta una classificazione tra razze resistente e suscettibili all'intossicazione da rame. Nella specie bovina, invece, l'importanza della componente razziale nel metabolismo del rame non si é molto studiata e poco si conosce sulla possibile predisposizione all'intossicazione che presentano le differenti razze.

Studi in campo, portati a termine precedentemente dal nostro gruppo di ricerca, su vitelli esposti naturalmente ad alti livelli di rame mediante pasti addizionati ripetutamente con purine di maiale ricche in rame, mettono in risalto che esistono differenze razziali nell'accumulo di rame a livello epatico, anche se sono necessari studi sperimentali maggiori per avvalorare questa scoperta.

L'obiettivo generale che noi volevamo raggiungere in questa tesi dottorale era quello di valutare sperimentalmente l'influenza della razza (Rubia gallega, Frisona ed incroci industriali delle due), per quanto riguarda il metabolismo e l'accumulo intraepatico del rame in vitelli allevati con sistema intensivo e con un livello di aggiunta del rame permesso dall'Unione Europea (35 mg/kg S.S; Regolamento CE N° 1334/2003 dalla commissione del 25 luglio 2003). Per ottenere questo, abbiamo considerato i seguenti obiettivi: 1) Valutare l'effetto della razza su diversi parametri sanguigni di rame durante tutto il ciclo riproduttivo dei vitelli; 2) Studiare le eventuali differenze razziali esistenti nella distribuzione e nell'accumulo organico (fegato, rene, muscolo, cuore, milza e cervello) di rame al macello; 3) Determinare l'esistenza di differenze razziali sulla distribuzione del rame nelle diverse regioni anatomiche del fegato; accertare la validità della biopsia epatica nel determinare l'accumulo intraepatico del rame; 4) Valutare l'influenza della razza nella distribuzione subcellulare del rame nel fegato (frazionamento subcellulare e concentrazione di metallotioneina) e sul possibile condizionamento nella

predisposizione degli animali a sopportare processi di accumulo cronico; 5) Valutare le ripercussioni organiche dell'accumulo di rame, mediante parametri ematologici e biochimici nelle differenti razze.

Per questo studio si sono utilizzati 30 vitelli, della razza Rubia gallega (n=11), Frisona (n=9) ed incroci industriali delle due (n=10) dall'età di 3 mesi fino al macello (circa a dieci mesi di età). Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi o lotti, determinati tramite la razza ed hanno ricevuto una dieta commerciale per l'accrescimento e l'ingrasso con una aggiunta di 35 mg di rame per kg di S.S. Sono stati prelevati mensilmente campioni di sangue, durante tutto il ciclo riproduttivo. Prima della macellazione è stata effettuata una biopsia epatica di tutti gli animali ed una volta macellati sono stati prelevati campioni di fegato, reni, cervello, cuore, milza e muscolo. I campioni di sangue intero ed i tessuti sono stati sottoposti a digestione acid in microonde e successivamente il livello di rame è stato determinato con ICP-OES. L'attività della ceruloplasmina nel siero è stata studiata mediante la tecnica della p-fenilenediamina. La concentrazione della meallotioneina nel fegato (lobo caudato), reni e cervello si è determinata tramite l'impiego della tecnica di saturazione dell'argento. I valori ematologici sono stati determinati mediante un contatore ematologico ed i valori biochimici mediante kits commerciali.

I risultati del nostro studio indicano che i livelli di rame consentiti dalla legislazione europea nei vitelli (35 mg/kg S.S.) durante tutto il ciclo produttivo (accrescimento ed ingrasso) raggiungono concentrazioni nel fegato superiori ai valori fisiologici. I vitelli di razza frisona presentano un accumulo totale di rame a livello epatico significativamente superiore a quelli di razza Rubia gallega (61%) ed agli incroci industriali delle due razze (23%). Tra tutta la specie bovina, la razza Frisona è quella che presenta una maggiore percentuale di animali (89%) con livelli epatici di rame tossici (>150 mg/kg P.V), contro il 70% degli incroci industriali ed il 40% nei vitelli di razza Rubia gallega.

A differenza di quanto avviene nel fegato, le concentrazioni di rame nel resto dei tessuti analizzati risultano essere basse per tutte e tre le razze considerate, e rientrano nei valori fisiologici propri di questa specie animale. I vitelli di razza Rubia gallega presentano concentrazioni di rame superiori a quelli di razza Frisona in tutti i tessuti, eccetto nel cervello; mentre gli incroci industriali hanno una posizione intermedia tra le due. Tuttavia in nessun caso questa differenza razziale raggiunge un significato importante a livello statistico.

A livello sanguigno, i vitelli di razza Rubia gallega presentano, in generale, durante tutto il ciclo riproduttivo, livelli di rame nel sangue, nel siero ed un'attività della ceruloplasmina, superiori a quelli della razza Frisona; mentre gli incroci industriali

occupano una posizione intermedia tra le due razze, ma senza nessuna rilevanza significativa a livello statistico.

I Maggiori livelli di rame nel siero e nel sangue e l'attività della ceruloplasmina nei vitelli della razza Rubia gallega, insieme ad una maggiore concentrazione di rame in tutti i tessuti analizzati, ed in comparazione con i vitelli della razza Frisona, potrebbero indicare che le differenze di accumulo di rame a livello epatico tra le due razze siano dovute, almeno in parte, ad una diversa capacità di distribuzione del rame epatico verso i tessuti, fondamentalmente in forma di ceruloplasmina.

Nel valutare l'accumulo di rame nei diversi lobi epatici abbiamo osservato che non esistono differenze razziali statisticamente significative; infatti si è riscontrata una tendenza o modello di distribuzione simile nei diversi lobi epatici per tutti e tre i gruppi di animali considerati. La maggior concentrazione di rame si riscontra sempre nel lobo sinistro, seguito dalla apofisi papilar; i livelli minori invece si riscontrano nel lobo caudato e quadrato. Queste differenze di accumulo del rame potrebbero essere giustificate per la diversa irrorazione sanguigna e per il diverso drenaggio biliare che presentano i vari lobi.

Il fatto che nel lobo sinistro, partendo da una concentrazione di rame approssimativamente di 200 mg/kg P.V. si raggiunga una fase di plateau, suggerisce che durante questa fase il modello di accumulo di rame potrebbe cambiare dando luogo ad un maggior accumulo nelle altre zone.

Nel valutare l'accumulo di rame nel fegato a livello subcellulare, non abbiamo riscontrato differenze razziali statisticamente significative né per quanto riguarda la concentrazione della metallotioneina né per la stessa unita al rame. In tutti gli animali del nostro studio la concentrazione di metallotioneina non è relazionata con la concentrazione totale di rame, anche se è altamente dipendente dallo status dello zinco dell'animale; inoltre, la capacità del rame ad unirsi alla metallotioneina è in funzione della concentrazione della stessa nella cellula epatica.

Neanche la distribuzione del rame nei diversi compartimenti cellulari (nucleo, organuli, microsoma e citosol) ha mostrato differenze significative tra le razze studiate. La maggior quantità si è riscontrata nella frazione granulare, seguita dal citosol e nucleo; mentre nella frazione microsomale la quantità di rame è molto bassa.

Per questo studio, la biopsia epatica risulta essere il procedimento più adeguato per determinare l'accumulo di rame a livello epatico, nel bestiame bovino.

Il fatto che gli incroci industriali mostrano, in generale, una posizione intermedia tra le due razze, per tutti i parametri studiati conferma nuovamente l'ipotesi della presenza di un componente genetico nel metabolismo del rame nel bestiame bovino.

L'aggiunta di rame, in dose di 35 mg/kg di S.S., durante la fase di accrescimento-ingrasso nelle tre razze studiate, ha causato effetti minimi sui parametri ematologici ed a livello biochimico ha modificato solo il metabolismo dei lipidi e del colesterolo, innalzando i livelli di colesterolo e trigliceridi nel siero. Infine gli enzima marker di danno epatico non forniscono risultati attendibili per l'accumulo epatico di rame.

Summary

Among the animal species there are important differences in their susceptibility to suffer disorders from copper (Cu) and ruminants are more susceptible to the Cu than the monogastric species. Consistently to the discovery of these differences among species, the breed studies turned out to be a major factor of increasing interest inside the research of the Cu metabolism, mainly in the sheep species, where there is actually a breed classification selecting them as resistant or susceptible to long-term poisoning for the above mentioned metal. In cattle, however, the importance of the breed component in the metabolism of the Cu has been scarcely studied and we hardly know about the possible susceptibility to the poisoning that lies within its breeds.

Our research team previously carried out field studies, where calves had been exposed to high concentrations of Cu from grasslands that were fertilized with pigs' manure that are naturally high in Cu. The studies made clear that the different breeds of cattle react differently to the accumulation of Cu at the hepatic level; nevertheless, more studies are required to support these conclusions.

The aim of this study was to evaluate the influence of the breed of calves (Galician blonde, Holstein Friesian and commercial cross-breed) on their metabolism and the intra-hepatic accumulation of Cu in calves kept on an intensive diet and with the maximum supply level of Cu allowed by the European Union, (Regulation CE N° 1334/2003 at the Commission of July 25, 2003), that consists of 35 mg Cu/kg dry matter (DM).

We established the following objectives: 1) To evaluate the effects of each breed over diverse blood parameters of Cu during a specific time on the life cycle in the calves. 2) To study the existence of breed differences in the distribution and organic accumulation of Cu in liver, kidney, muscle, heart, spleen and brain directly after the calves were slaughtered. 3) To determine the existence of breed differences on the distribution of the Cu in different anatomical areas of the liver, as well as to determine the validity of a hepatic biopsy done alive to verify the intra-hepatic accumulation of Cu. 4) To rate the influence of the breed in the sub-cellular distribution of Cu in the liver (sub-cellular separation and of metallothioneins (MTs) concentration) and their possible condition that might be affecting the susceptibility

of the animals to suffer chronic accumulation process. 5) To evaluate the organs aftereffects, with the organic accumulation of Cu, using hematology and biochemical parameters in the different breeds.

For this study, we used 30 calves of Galician blonde breed (n=11), Holstein Friesian (n=9) and commercial cross-breed between both (n=10) that were kept under experimental conditions since three months old until the moment of the slaughter (approximately at ten months of age).

The animals were divided into three groups determined by their breeds and they have received a controlled commercial diet for growth with a supply of 35 mg of Cu/kg DM. We have taken monthly collections of blood during the whole life cycle. We performed hepatic biopsies when the animals were alive just before they were slaughtered and took samples, as soon as the animals were slaughtered of the liver, kidney, brain, heart and spleen. The samples of entire blood and tissue were digested by microwave digestion system and the levels of Cu determined by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) later on. To measure the activity of ceruloplasmin (Cp) in serum used the p-phenylenediamine technique and the MT's concentration in liver (lobus caudatus), kidney and brain was determined by the silver saturation assay. We used a Hematology Meter Analyzer to determine the hematology parameters and the biochemical variables using commercial Test Kits.

The results of our study showed that when calves received the maximum supply of copper (Cu) allowed by the European Legislation (35 mg/kg dry matter) during the whole cycle (growth and fattening) led to concentrations of Cu in liver over the standard physiological levels for these breeds. The Holstein Friesian calves presented a total accumulation of Cu at hepatic level significantly higher than those of Galician blonde (61 %) and to the commercial cross-breed (23 %). The Holstein Friesian breed also showed the higher animal percentage (89 %) with toxicity at the hepatic level related to Cu, followed by the commercial crossing (70 %) and the calves of Galician blonde breed (40%).

On the contrary to what had happened in the liver, the concentrations of Cu in the rest of the analyzed tissues are low on the three groups, and the Cu concentrations in all the samples maintained the standard physiological values for these breeds. In all the tissues, with the exception of the brain, the Galician blonde calves breed presented higher concentrations of Cu compared to Holstein Friesian breed. The commercial crossing breed occupied an intermediate position between both breeds; nevertheless, there was not a statistical significant difference between breeds.

At blood level, the calves of Galician blonde breed broadly presented during the experiment the higher levels of Cu in blood, Cu in serum and activity of

ceruloplasmin than those of Holstein Friesian breed. The commercial crossing breed kept a median position between both breeds, although did not find statistical significant differences between all breeds.

Higher levels of Cu in serum, blood, ceruloplasmin activity and the higher concentration of extra-hepatic Cu in all the analyzed tissues in the Galician blonde calves compared to the Holstein Friesian calves breed. These differences among the accumulation of Cu at hepatic level between both breeds might indicate a different ability of these two breeds to relocate the hepatic Cu towards the tissues, fundamentally in the ceruloplasmin type.

When we evaluated the accumulation of Cu in the different hepatic lobes, we observed that there were not any statistically significant differences between Cu concentrations in the three breeds, although we found a predisposition or pattern of similar distribution in the different hepatic lobes for the three considered breeds: The higher concentrations of Cu were always located in the lobus dexter, followed by the processus papillaris, whereas the lower levels of copper are described in the lobus caudatus and lobus quadratus. These accumulation differences of Cu might be related to differences in the blood flow and on more limited bile excretion capacity.

We observed a plateau of Cu concentration at approximately (200 mg/kg w.wt.) in the lobus dexter. This result might indicate that the Cu accumulation pattern at this point might change displacing the Cu concentration to other location.

When we measured the accumulation of Cu in the liver at a sub-cellular level, we did not find significant breed differences neither in the metallothioneins (MTs) concentrations nor in the Cu bound to them. In all the animals of our study, the MTs concentration is not related to the total Cu concentration, although MTs concentration is highly dependent on the zinc (Zn) status in the animals.

The Cu capacity to bind to the MTs is a function of the MTs concentration in the hepatic cells. The Cu distribution in the different sub-cellular compartments (nucleus, big organelles, microsomes and cytosol) did not show either statistical significant difference between the considered breeds. Consequently, in the three groups, the higher Cu proportion is located in the granular fraction, followed by the cytosol and nucleus, whereas in the microsomal fraction the content of Cu is very low.

The determination of the Cu concentration done using hepatic biopsies (pre-mortem) is a satisfactory procedure to evaluate the hepatic Cu accumulation in beef cattle within this study conditions.

The Cu supply throughout the whole cycle in the three studied breeds did not show a significant variation on the hematology parameters. At a biochemical level, the Cu supply led to high levels of cholesterol and triglycerides in serum. And, in relation to

the marker enzymes (AST, GGT, GLDH, CK) that showed hepatic damage did not predict the Cu hepatic accumulation in the animals of this study.

Resumo

Dentro das especies animais existen importantes diferenzas na súa susceptibilidade a padecer procesos tanto de intoxicación como de deficiencia por cobre; así, os ruminantes son máis susceptibles ao cobre que as especies monogástricas. Consecuentemente ao achado destas diferenzas entre especies, a raza converteuse nun factor de crecente interese dentro do estudo do metabolismo do cobre, principalmente na especie ovina, onde se logrou clasificar as distintas razas en resistentes ou susceptibles a padecer intoxicación polo devandito metal. No gando vacún, con todo, a importancia do compoñente racial no metabolismo do cobre apenas se estudou e pouco se coñece sobre a posible susceptibilidade á intoxicación que presentan as diferentes razas. Estudos de campo levados a cabo previamente polo noso grupo de investigación en tenreiros expostos a altos niveis de cobre poñen de manifesto que existen diferenzas raciais na acumulación de cobre a nivel hepático, entanto son necesarios máis estudos experimentais para avalar estes achados.

O obxectivo desta Tese Doutoral é avaliar de forma experimental a influencia da raza (Rubia Galega, Frisoa, e cruces industriais de ambas as razas) sobre o metabolismo e a acumulación intrahepática de cobre en tenreiros mantidos en réxime intensivo e co nivel de suplementación máximo permitido pola Unión Europea (35 mg/kg materia seca; Regulamento CE Nº 1334/2003 dá Comisión de 25 de xullo de 2003). Para iso establecemos os seguintes obxectivos concretos: 1) Avaliar o efecto da raza sobre diversos parámetros sanguíneos de cobre durante todo o ciclo produtivo en tenreiros; 2) Estudar a existencia de diferenzas raciais na distribución e acumulación orgánica (fígado, ril, músculo, corazón, bazo e cerebro) de cobre no momento do sacrificio; 3) Determinar a existencia de diferenzas raciais sobre a distribución do cobre nas distintas rexións anatómicas do fígado, así como a validez da biopsia hepática in vivo para determinar a acumulación intrahepática de cobre; 4) Valorar a influencia da raza na distribución subcelular de cobre en fígado (fraccionamento subcelular e concentración de metalotioneínas) e o seu posible condicionamento na susceptibilidade dos animais a sufrir procesos de acumulación crónica; e 5) Avaliar as repercusións orgánicas da acumulación orgánica de cobre, a través de parámetros hematolóxicos e bioquímicos nas distintas razas.

Para este estudo utilizáronse 30 tenreiros das razas Rubia galega (n=11), Frisoa (n=9) e cruces industriais entre ambas (n=10) que foron mantidos en condicións de experimentación dende os tres meses de idade ata o momento do sacrificio (9-10 meses de idade). Os animais foron divididos en tres grupos ou lotes determinados polas razas e recibiron unha dieta comercial para crecemento e cebo cunha suplementación de 35 mg/kg de cobre MS. Tomáronse mostras de sangue mensualmente durante todo o ciclo produtivo. Unha vez sacrificados os animais tomáronse mostras de fígado, ril, cerebro, corazón, bazo e músculos. Realizáronse tamén biopsias hepáticas de todos os animais no momento previo ao sacrificio. As mostras de sangue enteiro e tecidos sometéronse a unha dixestión aceda en microondas e posteriormente os niveis de cobre determináronse por ICP-OES. A actividade de ceruloplasmina en soro levouse a cabo empregando a técnica de p-fenilenediamina. A concentración de metalotioneínas en fígado (lóbulo caudado), ril e cerebro determinouse empregando unha técnica de saturación por prata. Os valores hematolóxicos foron determinados mediante un contador hematolóxico e as variables bioquímicas mediante kits comerciais.

Os resultados do noso estudo poñen de manifesto que a suplementación de cobre en tenreiros ao nivel máximo que permite a lexislación europea (35 mg/kg MS) durante todo o ciclo produtivo (crecemento e cebo) alcánzanse concentracións de cobre en fígado por encima dos niveis fisiolóxicos. Os tenreiros de raza Frisoa presentan unha acumulación total de cobre a nivel hepático significativamente superior aos de raza Rubia galega (61%) e aos cruces de ambas as razas (23%). A raza Frisoa é ademais a que presenta unha maior porcentaxe de animais (89%) con niveis hepáticos de cobre asociados con toxicidade (>150 mg/kg peso fresco), fronte ao 70% nos cruces industriais e ao 40% nos tenreiros de raza Rubia Galega.

A diferenza do que ocorre no fígado, as concentracións de cobre no resto dos tecidos analizados son baixas nos tres grupos raciais considerados, e sitúanse en todos os casos dentro dos valores fisiolóxicos para esta especie animal. Os tenreiros de raza Rubia galega presentan concentracións de cobre superiores aos de raza Frisoa en todos os tecidos, a excepción do cerebro, ocupando os cruces industriais unha posición intermedia entre ambas razas, aínda que en ningún caso as diferenzas entre razas atopadas alcanzan significación estatística.

A nivel sanguíneo, os tenreiros de raza Rubia galega presentan en xeral durante todo o ciclo produtivo niveis de cobre en sangue, cobre en soro e actividade ceruloplasmina superiores aos de raza Frisoa, ocupando os cruces industriais unha posición intermedia entre ambas razas, pero sen ningún efecto estatístico significativo. Os maiores niveis de cobre en soro e sangue e actividade ceruloplasmina en tenreiros de raza Rubia galega, xunto cunha maior concentración de cobre en todos os tecidos analizados, en comparación cos tenreiros de raza Frisoa,

poderían indicar que as diferenzas na acumulación de cobre a nivel hepático entre ambas as razas poidan deberse, polo menos en parte, a unha distinta capacidade de redistribución do cobre hepático cara aos tecidos, fundamentalmente en forma de ceruloplasmina.

Ao avaliar a acumulación de cobre nos distintos lóbulos hepáticos observamos que non existen diferenzas raciais estatisticamente significativas, aínda que atopamos unha tendencia ou patrón de distribución similar nos distintos lóbulos hepáticos para os tres grupos de animais considerados: as maiores concentracións de cobre situáronse sempre no lóbulo esquerdo, seguido da apófise papilar, mentres que os menores niveis de cobre descríbense nos lóbulos caudado e cadrado. Estas diferenzas de acumulación de cobre poderían estar xustificadas por unha diferenza no fluxo sanguíneo e capacidade de drenaxe biliar. O feito de que no lóbulo esquerdo a partir dunha concentración de cobre de aproximadamente 200 mg/kg peso fresco se alcance unha fase de meseta, suxire que a partir desa concentración o patrón de acumulación de cobre a nivel hepático podería cambiar dando lugar a un maior acumulo noutras localizacións.

Ao avaliar a acumulación de cobre no fígado a nivel subcelular, non atopamos diferenzas raciais estatisticamente significativas nas concentracións de metalotioneínas nin no cobre unido ás mesmas. En todos os animais do noso estudo a concentración de metalotioneínas non está relacionada coa concentración total de cobre, aínda que se é altamente dependente do status de zinc do animal; ademais, a capacidade do cobre para unirse ás metalotioneínas é función da concentración das mesmas na célula hepática. A distribución de cobre nos distintos compartimentos subcelulares (núcleo, grandes organelas, microsomas e citosol) tampouco mostrou diferenzas significativas entre as razas estudadas. Así, para todos os grupos raciais considerados, a maior proporción de cobre atópase na fracción granular, seguida do citosol e núcleo, mentres que na fracción microsomal o contido de cobre é moi baixo.

A determinación da concentración de cobre en biopsias hepáticas in vivo é un procedemento axeitado para a determinación da acumulación de cobre a nivel hepático en gando vacún nas condicións deste estudo.

A suplementación de cobre durante todo o ciclo produtivo nas tres razas estudadas non mostrou influencia significativa sobre os parámetros hematolóxicos. A nivel bioquímico a suplementación de cobre dá lugar a niveis altos de colesterol e triglicéridos en soro. As enzimas marcadoras de dano hepático non son bos predictores da acumulación hepática de cobre nos animais deste estudo.

Bibliografía

- Abraham, P.A., Evans, J.L., 1972. Cytochrome oxidase activity and cardiac hypertrophy during copper depletion and repletion. *Trace Substances in Environmental Health-V*, University of Missouri, Columbia, 335.
- Adham, N.D., Song K., 1980. Effect of calcium and copper on zinc absorption in the rat. *Nutr. Metab.* 24: 281.
- Allen, W.M., Sansom, B.F., Gleed, P.T., Mallinson, C.B., Drake, C.F., 1984. Boluses of controlled release glass for supplementing ruminants with copper. *Vet. Rec.* 115: 55.
- Allen, J.D., Gawthorne, J.M., 1987a. Interactions between proteins, thiomolybdates and copper. Proc. 6th Symposium. *Trace Elements in Man and Animals*. New York: Plenum. 315-316.
- Allen, J.D., Gawthorne, J.M., 1987b. Effect of molybdenum treatments on the distribution of Cu and metallothionein in tissue extracts from rats and sheep. *J. Inorg. Biochem.* 31: 161-170.
- Alloway, B.J., 1973. Copper in metabolism in sway-back pastures. *J. Agr. Sci.* 80: 521-524.
- Amer, A.M., Elliot, J.I. 1973. Effects of level of copper supplement and removal of supplemental copper from the diet on the physical and chemical characteristics of porcine depot fat. *Can. J. Anim.Sci.* 53: 139-145.
- Andrewartha, K.A., 1978. Role of Erythrocyte Glutathione in the metabolism of copper and selenium by sheep. *Victorian Veterinary Proceedings.* 36: 42.
- Angel, I., Bar, A., Horovitz, T., Taler, G., Krakovsky, M., Resnitsky, D., Rosenberg, G., Striem, S., Friedman, J.E., Kozak, A., 2002. Metal ion chelation in neurodegenerative disorders. *Drug Dev. Res.* 56: 300-309.
- Anke, M., Henning, A., Schneider, H.J., Ludke, H., Von Gagern, W.y Schlegel, H., 1970. The interrelations between cadmium, zinc, copper and iron in metabolism of hens, ruminants and man. *Trace elements Metabolism in Animals.* 317.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Gonzalez, M., Speisky, H. , Uauy, R., 2003. Copper exposure and potential biomarkers of copper metabolism. *Biometals* 16: 199-204.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Bonvin, A.M.J.J., 2004. A docking approach to the study of copper trafficking proteins: Interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure* 12: 699-676.
- Arnhold, W., Anke, M., Glei, M., Rideout, B., Stalis, I., Lowenstine, L., 1998a. Determination of copper status in ruminants. *Trace Elem. Electroly.* 15(2): 65-69.
- Arnhold, W., Anke, M., Rideout, B., 1998b. Copper status in endangered deer species. *Proceedings of the 4th International Deer Biology Congress*, Hungary.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mazariegos, D., Núñez, M.T., 2003. Iron and copper transport by DMT1 in Caco-2cells. *Biometals.* 16(1): 231.

- Arthington, J.D., Corah, L.R., Blecha, F., 1996. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpes-virus-1. *J. Anim. Sci.* 74: 211-217.
- Arthur, J.R., Boyne, R., 1985. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxide Activities in Neutrophils from Selenium Deficient and Copper Deficient Cattle. *Life. Sci.* 36: 1569-1575.
- Arzul, G., Maguer, J.F., 1990. Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Mar. Pollut. Bull.* 21(9): 431-434.
- Askari, A.C., Long, C.L., Blakemore, W.S., 1979. Urinary zinc, copper, nitrogen, and potassium losses in response to trauma. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 3: 151-156.
- Askari, A.C., Long, C.L., Blakemore, W.S., 1982. Net metabolic changes of zinc, copper, nitrogen, and potassium balances in skeletal trauma patients. *Metabolism.* 31: 1185-1193.
- Askwith, C., Eide, D., Van, H.A., Bernard, P.S., Li, L., Davis, K.S., 1994. The FeT3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell.* 76: 403-411.
- Auza, N.J., Olson, W.G., Murphy, M.J., Linn, J.G., 1999. Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 1624-1628.
- Awad, Y.L., Ahmed, A.A., Lotfi, A.Y., Fahmy, F., 1973. The influence of selenium administration on copper levels and growth of lambs. *Zbl. Vet. Med. A.*, 20: 742-747.
- Badiei, K., Darboui, M., 1999. Measurement and correlation of liver, kidney and plasma copper concentrations and haemoglobin in Holstein cattle. *J. Appl. Anim. Res.* 15(2): 131-136.
- Bak, J., Jensen, J., Larsen, M.M., Pritzl, G., Scott-Fordsmand, J., 1997. A heavy metal monitoring -programme in Denmark. *Sci. Total Environ.* 207: 179-186.
- Bakalli, R. I., Pesti, J. M., Ragland, W. L., Konjfuca, V. 1995. Dietary copper in excess of nutritional requirements reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. *Poult. Sci.* 74: 360-365.
- Baker, D.H., Ammerman, C.B., 1995. Copper bioavailability. En: Ammerman, C.B., Baker, D.H., Lewis, A.J. (eds). *Bioavailability of Nutrients for Animals. Academic Press, New York.* 127-156.
- Baker, A., Turkey, E., Bonham, M.P., O'Connor, J.M., Strain, J.J., Flynn, A., Cashman, K.D., 1999. No effect of copper supplementation on biochemical markers of bone metabolism in healthy adults. *British J. Nutr.* 82: 283-290.
- Bakka, A.; Webb, M., 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate: changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem. Pharmacol.* 30: 721-25.
- Bakley, B.R., Berzowski, J.A., Shiefer, H.B., 1982. Chronic copper toxicity in a dairy cow. *Can. Vet. J.* 23: 190-192.
- Bang, K.S., Familton, A.S., Sykes, A.R., 1990. Effect of Ostertagiasis on copper status in sheep: a study involving use of copper oxide wires particles. *Res. Vet. Sci.* 49: 306-314.
- Barboza, P.S., Blake, J.E., 2001. Ceruloplasmin as an indicator of copper reserves in wild ruminants at high latitudes. *J. Wild. Dis.* 37(2): 324-331.
- Barceloux, D.G., 1999 a. Copper. *Clinical Toxicology.* 37(2):217-230.
- Barceloux, D.G., 1999 b. Molybdenum. *Clinical Toxicology.* 37(2): 231-237.
- Barlow, R.M., 1963. Further observations on swayback. 1. Transitional *pathology and Therapeutics.* 73: 51-60.

- Batey, T., Berryman, C., Line, C., 1972. The disposal of copper-enriched pig manure slurry on grassland. *J. Br. Grassland Soc.* 27: 139-143.
- Baumgartner, S., Brown, D.J., Salevsky, E., Jr y Leach, R.M., Jr., 1978. Copper deficiency in the laying hen. *J. Nutr.* 108: 804-811.
- Bebe, F.N., Panemangalore, M., 1997. Modulation of tissue trace metal concentrations in weanling rats different levels of zinc and exposed to oral lead and cadmium. *Nutr. Res.* 16(8): 1369-1380.
- Beisel, W.R., Pekarek, R.S., Wannemacher, R.W.Jr., 1974. The impact of infectious disease on trace element metabolism of the host. En: *Trace Element Metabolism in Animals-2*. W, G, Hoekstra, J.W., Suttie, H.E., Ganther, W. Mertz (eds). Baltimore, M.D: Univ. Park. 217-240.
- Benedito, J.L., Díaz de Pablo, C., Ayala, I., Castillo, C., Ríos, M.A., Miranda, M., López Alonso, M., Hernández, J., García Partida, P. (1998). Deficiencia de cobre en un rebaño de la provincia de Lugo (España). En: *Proceedings of the 6th Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*. Zadnik, T., Jazbec, I., Fatur, B. (editors). Ed. Tiskarna Univerze, Slovenia. 236-238.
- Benemariya, H., Robberecht, H., Deelstra, H., 1993. Zinc, copper, and selenium in milk and organs of cow and goat from Burundi, Africa. *Sci. Total Environ.* 128 : 83-98.
- Berry, J.P., Zhang, L., Galle, P., 1995. Interaction of selenium with copper, silver, and gold salts-electron-microprobe study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology.* 27 (1): 21-28.
- Berthon, G., 2000. Does human beta A4 exert a protective function against oxidative stress in Alzheimer's disease?. *Medical Hypotheses* 54: 672-677.
- Beshgetoor, D., Hambidge, M., 1998. Clinical conditions altering copper metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 1017-1021.
- Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T., 2000. Copper toxicity in cattle. *Vet. Rec.* 147: 399-400.
- Bienengraber, M., Forderkunnz, S., Klein, D., Summer, K.H., 1995. Determination of Cu-containing metallothionein. Comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay and enzyme-linked-immunosorbent assay. *Anal. Biochem.* 228(1): 69-73.
- Binnerts, W.T., 1986. De koperstatus van het rundvee in Nederland. The copper status of cattle in the Netherlands. *Tijdschr.Diergeneeskd.deel* 111,afl.7: 321-324.
- Bires, J., Vrzgula, L., Juhasova, Z., 1991a. Distribution of harmful metals in sheep organisms after experimental industrial contaminant intake. *Vet. Med.* 36(6): 361-371.
- Bires, J., Kovac, G., Vrzgula, L., 1991b. Interactios between copper and selenium in sheep in the course of experimentally-produced copper intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.* 33: 489-491.
- Bires, J., Vrzgula, L., Weisssova, T., Vrzgulova, M., Baldovic, R., 1995. Distribution of Cu, Fe, As, Cd and Pb in sheep organisms after experimental intoxication with copper-oxide from industrial flue dust. *Tierarztl. Umsch.* 50(5):364-367.
- Blanco-Penedo, I., Cruz, J.M., López Alonso, M., Miranda M., Castillo C., Hernández J., Benedito, J.L. 2006. Influence of copper status on the acumulation of toxic and essential metals in cattle. *Environ. Int.* 32: 901-906.
- Blakley, B.R., Hamilton, D.L., 1985. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Can. J. Com. Med.* 49:405-408.
- Blalock, T.L., Dunn, M.A., Cousins, R.J., 1988. Metallothionein gene expression in rats tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* 118: 222-228.

- Bohman, V.R., Drake, E.L., Behrens, W.C., 1984. Injectable copper and tissue composition of cattle. *J. Dairy Sci.* 67: 1468-1473.
- Bohman, V.R., Poole, Kvasnicka, Tronstad, Collison., 1987. The toxicology and composition of bovine tissues after parenteral administration of high levels of copper salts. *Vet. Human Toxicol.* 29: 307-312.
- Boila, R.J., Devlin, T.J., Drysdale, R.A., Lillie, L.E., 1984. Supplementary copper for grazing beef cattle-injectable copper glycinate and copper sulfate in free-choice mineral supplements. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 675-696.
- Botha, C.J., Nande, T.W., Swan, G.E., 1993. The cupruritic effect of two chelators following copper loading in sheep. *Vet. Human Toxicol.* 35: 409-413.
- Bounias, M., Purdey, M., 2002. Transmissible spongiform encephalopathies: a family of etiologically complex diseases-a review. *Sci. Total Environ.* 297: 1-19.
- Bradley, C.H., 1993. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. *Can. Vet. J.* 34: 287-292.
- Brady, FO; Helvig, B., 1984. Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. *Am. J. Physiol.* 247: 319-322.
- Branion, H.D., 1960. Conditioned copper deficiency in cattle. Proc. Eight International Grassland Congress. 564. University of Reading, U.K.
- Braude, R., Ryder, K., 1973. Copper levels in diets in growing pig. *J. Agric. Soc.* 80: 489.
- Bremner, I., 1970. Zinc, copper and manganese in the alimentary tract of sheep. *Br. J. Nutr.* 24: 769-783.
- Bremner, I., 1980. Absorption, transport and distribution of copper. *Excerpta Medica on Ciba Foundation Symposium* 79: 23-48.
- Bremner, I., 1987. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J. Nutr.* 117: 19-29.
- Bremner, I., 1991a. Metallothionein and copper-metabolism in liver. *Methods in enzymology.* 205: 584-591.
- Bremner, I., 1991b. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods in enzymology.* 205: 25-35.
- Bremner, I., 1998. Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5): 1069-1073.
- Bremner, I., Marshall, R.B., 1974. Hepatic copper-and zinc-binding proteins in ruminants. 2. Relationship between Cu and Zn concentrations and the occurrence of a metallothionein-like fraction. *Br. J. Nutr.* 32: 293-299.
- Bremner, I., Davies, N.T., 1976. The induction of metallothionein in rat liver by zinc injections and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149: 733-738.
- Bremner, I., Young, B.W., 1976. Isolation of (Copper, Zinc)-th pig liver. *Biochem. J.* 155: 631-635.
- Bremner, I., Williams, R.B., Young, B.W., 1977. Distribution of copper and zinc in the liver of the developing sheep foetus. *Br. J. Nutr.* 38: 87-92.
- Bremner, I., Hoekstra, W.G., Davies, N.T., Young, B.W., 1978. Effect of zinc status of rats on the synthesis and degradation of copper induced metallothionein. *Biochem. J.* 174: 883-892.
- Bremner, I., Mills, C.F., 1981. Absorption, transport and tissue storage of essential trace elements. *Phil. Trans. R. Lond. B.* 294: 75-89.
- Bremner, I., Williams, R.B., Young, B.W., 1981. The effects of age, sex and zinc status on the accumulation of (copper-zinc)-metallothionein in rat kidneys. *J. Inorg. Biochem.* 14(2): 135-146.

- Bremner, I., Mehra, R.K., 1983. Metallothionein: some aspects of its structure and function with special regard to its involvement in copper and zinc metabolism. *Chemica Scripta*, 21: 117-121.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1990. Metallothionein and trace minerals. *Annual Reviews Nutrition*. 10: 63-83.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: Speciation and interactions. *Proc. Nutr. Soc.* 54: 489-499.
- Brewer, G.J., Hill, G.M., Prasad, A.S., Cossack, Z.T., Rabbani, P., 1983 Oral zinc therapy for Wilson's Disease. *Ann. Intern. Med.* 99: 314-320.
- Brewer, G.J., Hill, G.M., Dick, C.; Prasad, A.S., Cossack, Z.T., 1985. Interactions of trace elements: Clinical significance. *J. Am. Coll. Nutr.* 4: 33-38.
- Brinckerhoff, C.E., Coffey, J.W., Sullivan, A.C., 1983. Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. *Science*. 221: 756-758.
- Brown, D.R., Mohn, C.M., 1999. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *GLIA*. 25: 282-292.
- Buck, W.B., 1970. Diagnosis of feed-related toxicoses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156: 1434-1443.
- Buckingham, K., Heng-Khou, C.S., Dubick, M., Lefevre, M., Cross, C., Julian, L., Rucker, R., 1981. Copper deficiency and elastin metabolism in avian lung. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 166: 310-319.
- Buckley, W.T., Huckin, S.N., Fisher, L.J., Eigendorf, G.K., 1986. Effect of selenium supplementation on copper metabolism in dairy cows. *Can.J.Anim.Sci.* 66: 1009-1018.
- Bulgin, M.S., Maas, J., Anderson, B.C., Klugh, D., Linconln, S.D., Lane, V.M., 1986. Death associated with parenteral administration of copper disodium edetate in calves. *JAVMA*. 88(4): 406-409.
- Bush, J.A., Jensen, W. N., Athens, J.W., Ashenbrucker, H., Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M., 1956. Studies on copper metabolism. XIX. The kinetics of iron metabolism and erythrocyte life-span in copper-deficient swine. *J. Exp. Med.* 103: 701.
- Butler, E.J., 1963. The influence of pregnancy on the blood, plasma and ceruloplasmin copper levels of sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* 9: 1-12.
- Cabral, F., Vasconcelos, E., Cordovil, C.M.D.S., 1998. Effects of soil phase from pig slurry on iron, copper, zinc and magnanese content of soil and wheat plants. *J. Plant Nutrition*. 21(9): 1955-1966.
- Caffrey, J.M., Dasmahapatra, A., Smith, H.A., Hede, K., Frieden, E., 1986. The Effect of Copper Ion on Glutathione and Hemolysis in Rabbit Erythrocytes. *Biological Trace Element Research*. 11: 19-26.
- Cameron, H.J., Boila, R.J., McNichol, L.W., Stanger, N.E., 1989. Cupric oxide needles for grazing cattle consuming low-copper, high-molybdenum forage and high-sulfate water. *J. Anim. Sci.* 67: 252-261.
- Campbell, C.H., Brown, R., y Linder, M.C., 1981. Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells. *Biochem. Biophys. Acta*. 678: 27-38.
- Carballas Fernández, T., Díaz-Fierros Viqueira, F., 1990. *El Purín de vacuno en Galicia. Caracterización, poder fertilizante y problemas ambientales*. Ed. Gráficas Minerva S.L. Santiago de Compostela.

- Carlos, G., Zervas, G., Driver, P.M., Anderson, P., Illingworth, D., Al- Tekrity, S. A., Telfer, S.B., 1985. The effect of soluble glass boluses on the copper, cobalt, and selenium status of Scottish Blackface ewes, In: Proc. 5th. Int. Symp. On Trace Element Metabolism in Man and Animals. Mills, C.F., Bremner, I., Chesters, J.K., (eds). *Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K.* 714.
- Cavanagh, N.A., Judson, G.J., 1994. Copper-oxide powder as a supplement for sheep. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*. 8(3-4): 183-188.
- Cerkleroski, F.L., Forbes, R.M., 1977. Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat. *J. Nutr.* 107: 143.
- Chao, P.Y., Allen, K.G.D., 1992. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 12: 145-150.
- Charmley, L.L., Symonds, H.W., 1985. A comparison of the ability of cattle and pigs to clear excess copper from the plasma and excrete it in bile. *Commonwealth Agriculture Bureau Scotland*. 5: 339-341.
- Chen, Y., Saari, J.T., Kang, Y.J., 1995. Expression of σ -glutamyl cysteine synthetase in the liver of copper deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 210: 102-106.
- Cherian, M.G., 2003. Metallothionein in homeostasis and oxidative damage of copper. *Biometals*. 16(1): 226.
- Choudhury, H., Hastings, L., Menden, E., Brockman, D., Cooper, G.P., Petering, H.G., 1978. En: Trace Element Metabolism in Man and Animals-3. M. Kirchgessner (ed). *Freising-Weihenstephan:Arbeitsgemeinschaft für Tierernährungsforschung*. 549.
- Chowdhury, B., Chandra, P., 1987. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. *Progr. Fd. Nutr. Sci.* 11: 55-113.
- Christie, Costa, M., 1984. In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. *Biol. Trace Elem. Res.* 6: 139-158.
- Christie, P., Beattie, J.A.M., 1989. Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application. *J. Appl. Ecol.* 26: 597-612.
- Cleary, E.G., Fanning, J.C., 1975. Effects of copper deficiency on connective tissues in sheep. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2: 75.
- Coleman, M.E., Elder, R.S., Basu, P., Koppelaar, G., 1992. Trace elements in edible tissues of livestock and poultry. *J. AOAC Int.* 75(4): 615-625.
- Cook, C.M., Vardaka, E., Lanaras, T., 1997. Concentrations of Cu, and chlorophyll content of field-cultivated wheat growing in naturally enriched Cu soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 248-253.
- Coppenet, M., Golven, J., Simon, J.C., Le Corre, L., Le Roy, M., 1993. Chemical evolution of soils in intensive animal-rearing farms. The example of Finistère. *Agronomie*. 13(2): 77-83.
- Corah, L.R., Ives, S., 1991. The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice*. 7(1): 41-57.
- Corbett, W.S., Saylor W.W., Long, T.A., Leach, R.M., 1978. Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper-loaded sheep. *J. Anim. Sci.* 47: 1174-1179.
- Cosson, R.P., 1994. Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pre-treatment by zinc. *Biometals*. 7: 9-19.
- Counotte, G.H.M., Hartmans, J., 1989. Reaction between selenium content and glutathione-peroxidase activity in blood of cattle. *Vet. Q.* 11: 155-160.
- Cousins, R.J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Phys. Rev.* 65: 238-309.

- Croubels, S., Baert, K., Torck, T., Deprez, P., De Backer, P., 2001. Chronic copper intoxication in veal calves. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 70(2): 142-146.
- Crow, G., Smart, M.E., Stricklin, W.R., Christensen, D.A., Janzen, E.D., 1980. Breed, age and sex effects on blood plasma copper levels in beef cattle. Dept. Anim. Poult. Sci. University of Saskatchewan, Saskatoon. *Res. Rep. Pub.* 411: 19-21.
- Cruz, J.M. (2005). *Estudio sobre la acumulación de cobre y de los factores de variación en ganado vacuno procedente de la Comarca del Deza*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Dameron, C.T., Harrison, M.D., 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(supl): 1091-1097.
- Day, F.A., Panemangalore, M., Brady, F.O., 1981. In vivo and ex vivo effects of copper rat liver metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168: 306-310.
- De la Torre, A.I., Jiménez, J.A., Carballo, M., Fernández, C., Roset, J., Muñoz, M.J., 2000. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. *Chemosphere*. 41: 1629-1635.
- Deland, M.P.B., Cunningham, P., Milne, M.L., Dewey, D.W., 1979. Copper administration to young calves: oral dosing with copper oxide compared with subcutaneous copper glycinate injection. *Aust. Vet. J.* 55: 493.
- Denko, C.W., 1979. Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Actions*. 9: 333-336.
- Dhawan, D., Singh, B., Chand, B., Singh, N., Mangal, P.C., 1995. X-ray fluorescence in the assessment of inter-elemental interaction in rat liver following lead treatment. *Biometals*. 8: 105-110.
- Dixon, J.W., Sarkar, B., 1974. Isolation, amino acid sequence and copper (II)-binding properties of peptide (1-24) of dog serum albumin. *J. Bio. Chem.* 249: 5872-5877.
- Dormandy, T.L., 1980. Free radical reactions in biological systems. *Am. R. Coll. Surg. Engl.* 62: 188-194.
- Dorton, K.L., Engle, T.E., Hamar, D.W., Siciliano, P.D., Yemm, R.S., 2003. Effects of copper source and concentration on copper status and immune function in growing and finishing steers. *Animal Feed Science and Technology*. 110: 31-44.
- Dougherty, J.J., Hoekstra, W.G., 1982. Effects of vitamin E and selenium on copper-induced lipid peroxidation in vivo and on acute copper toxicity. *Proc. Soc. Exo. Biol. Med.* 169: 201-208.
- Doyle, J.J., Pfander, W.H., 1975. Interactions of cadmium with copper, iron, zinc, and manganese in ovine tissues. *J. Nutr.* 105 : 599.
- Du, Z., Hemken, R.W., Harmon, R.J., 1996. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulphate or copper proteinate. *J. Dairy Sci.* 79: 1873-1880.
- Dudley, R., Gammal, L., Klassen, C., 1985. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 414-426.
- Duncan, J.R., Prasse, K.W., 1986. *Veterinary Laboratory Medicine*, Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Dunlop, G., Innes, J.R.M., Shearer, G.D., Wells, H.E., 1939. The feeding of copper to pregnant ewes in the control of swayback. *J. Comp. Pathol.* 52: 259.
- Eckert, G.E., Greene, L.V., Carsteens, G.E., Ramsey, W.S., 1999. Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *J. Anim. Sci.* 77: 244-249.

- Eife, R., Weiss, M., Müller-Hocker, J., Lang, T., Barros, V., Sigmund, B., Thanner, F., Welling, P., Lange, H., Wolf, W., Podeck, B., Kittel, J., Schramel, P., Reiter, K., 1999. Chronic poisoning by copper in tap water: II. Copper intoxication with predominantly systemic symptoms. *Eur. J. Med. Res.* 4: 224-228.
- Eleftheriou, E.P., Karataglis, S., 1989. Ultrastructural and morphological characteristic of cultivated wheat growing on Cu-polluted fields. *Bot. Acta.* 102: 134-140.
- El-Gallad, T.T., Mills, C.F., Bremner, I., Summers, R., 1983. Thyomolybdates in rumen contents and rumen cultures. *J. Inorg. Biochem.* 18: 323-334.
- Ellen, G., Vanloon, J.W., Tolsma, K., 1989. Copper, chromium, manganese, nickel and zinc in kidney of cattle, pigs, and sheep and in chicken livers in Netherlands. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189 (6): 534-537.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000a. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2446-2451.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000b. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2452-2458.
- Engle, T.E., Spears, J.W., Armstrong, C.L., Wright, Odle, J., 2000a. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78: 1053-1059.
- Engle, T.E., Spears, J.W., Xi, L., Edens, F.W., 2000b. Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentrations in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78 (10): 2737-2744.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2001. Performance, carcass characteristics and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentrations of copper. *J. Anim. Sci.* 79: 2920-2925.
- Engle, T.E., Fellner, V., Spears, J.W., 2001. Copper Status, Serum Cholesterol and Milk Fatty Acid Profile in Holstein Cows Fed Varying Concentrations of Copper. *J. Dairy Sci.* 84: 2308-2313.
- Esselink, H., van der Geld, F.M., Jager, L.P., Posthuma-Trumpie, G.A., Zoun, P.E.F., Baars, A.J., 1995. Biomonitoring heavy metals using the Barn Owl (*Tyto Alba Guttata*): Sources of variation especially relating to body condition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 471-486.
- Evans, G.W., 1973. Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiological Reviews.* 53: 535-570.
- Evans, G.W., Wiederanders, R.E., 1968. Effect of hormones on ceruloplasmin and copper concentrations in the plasma of the rat. *Am. J. Physiol.* 214: 1152-1154.
- Evans, G.W., Myron, D.R., Wiederanders, R.E., 1969. Effect of protein synthesis inhibitors on plasma ceruloplasmin in the rat. *Am. J. Physiol.* 216: 340-342.
- Evans, G.W., Cornatzer, N.F., Cortnazer, W.E., 1970a. Mechanism for hormone-induced alterations in serum ceruloplasmin. *Am. J. Physiol.* 218: 613-615.
- Evans, G.W., Majors, P.F., Cornatzer, W.E., 1970b. Ascorbic acid interaction with metallothionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1244-1247.
- Evans, G.W., Myron, D.R., Cortnatzer, N.F., Cortnazer, W.E., 1970c. Age-dependent alterations in hepatic subcellular copper distribution and plasma ceruloplasmin. *Am. J. Physiol.* 218: 298-300.
- Fahrenbach, W.H., Sandberg, L.B., Cleary, E.G., 1966. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.* 155: 563.

- Falandysz, J., 1993. Some toxic and essential trace metals in cattle from the northern part of Poland. *Sci. Total Environ.* 136: 177-191.
- Farmer, P.E., Adams, T.E., Humphries, W.R., 1982. Copper supplementation of drinking water for cattle grazing molybdenum rich pastures. *Vet. Rec.* 111: 193.
- Farmer, P.E., 1983. The use of copper tablets to supplement the drinking water of cattle grazing "Teart" pastures. En: Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice, Suttle, N.F., Gunn, R.G., Allen, W.M., Linklater, K.A., y Wiener, G. (eds). *Occasional Publication No. 7, British Society of Animal Production*, Edinburgh, 142.
- FEDNA, 1999. Fuentes de microminerales. Disponible en: http://www.etsia.upm.es/fedna/minerales/fuentes_microminerales.htm
- Feldman, S.L., Failla, M.L., Cousins, R.J., 1978. Degradation of liver metallothionein in vitro. *Biochim. Biophys. Act.* 544: 638-646.
- Fell, B.F., Dinsdale, D., Mills, C.F., 1975. Changes in enterocyte mitochondria associated with deficiency of copper in cattle. *Res. Vet. Sci.* 18: 274.
- Fisher, P.W.F., Labbé, M.R., Giroux, A., 1990. Effects of age, smoking, drinking, exercise and estrogen use on indices of copper status in healthy adults. *Nutr. Res.* 10: 1081-1090.
- Floris, G., Medda, R., Padiglia, A., Musci, G., 2000. The physiopathological significance of ceruloplasmin-A possible therapeutic approach. *Biochem. Pharmacol.* 60(12): 1735-1741.
- Foulkes, E.C., 1993. Metallothionein and glutathione as determinants of cellular retention and extrusion of cadmium and mercury. *Life Sci.* 52: 1617-1620.
- Freeland, J.H., Cousins, R. J., Schwartz, R., 1976. Relationship of mineral status and intake to periodontal disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 745-749.
- Freudenberger, D.O., Familton, A.S., Sykes, A.R., 1987. Comparative aspects of copper metabolism in silage-fed sheep and deer (*Cervus elapbus*). *J. Agr. Sci.* 108: 1-7.
- Frieden, E., 1980. Caeruloplasmin: a multifunctional metalloprotein of vertebrate plasma. *CIBA Foundation Symposium* 79: 93-124.
- Frieden, E., 1986. Perspectives on Copper Biochemistry. *Clin. Physiol. Biochem.* 4: 11-19.
- Funk, A.E., Day, F.A., Brady, F.O., 1987. Displacement of zinc and copper from copper-induced metallothionein by cadmium and by mercury: in vivo and ex vivo studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 1-6.
- Gailer, J., 2002. Reactive selenium metabolites as targets of toxic metals/metalloids in mammals: a molecular toxicological perspectives. *Appl. Organomet. Chem.* 16(12): 701-707.
- Galey, F.D., Maas, J., Tronstad, R.J., Woods, L.W., Jonson, B.J., Littlefield, E.S., Wallstrum, R., Dorius, L.C., 1991. Copper toxicosis in two herds of beef calves following injection with Copper disodium edetate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 260-263.
- Gallagher, C.H., 1979. Biochemical and Pathological effects of copper deficiency. En: *Copper in the Environment*, Part II : Health Effects. Miagu, J.D. (ed). John Wiley y Sons, New York, 57.
- García-Fernández, A.J., Motas Guzman, M., Navas, I., María Mojica, P., Romero, D., 1999. Sunflower meal as cause of chronic copper poisoning in lambs in southeastern Spain. *Can. Vet. J.* 40: 799-801
- Garrick, M.D., Dolan, K.G., Ghio, A., Horbinski, C., Higgins, D., Porubcin, M., 2003a. DMT1 (Divalent Metal Transporter): a mammalian transporter for multiples metals. *Biometals.* 16(1): 41-41.
- Garrick, M.D., Nunez, M.T., Olivares, M., Harris, E.D., 2003b. Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals* 16(1): 1-8.

- Gartrell, J.W., 1981. Distribution and correction of copper deficiency in crops and pastures. En: *Copper soils and Plants*. Loneragan, J.F.; Robson, A.D., Graham, R.D. (eds). Academic Press, Sidney, 313.
- Gawthorne, J.M., 1987. Copper interactions. En: *Copper in Man and Animals*. J.M. Howell, J.M. Gawthorne (eds). 1: 79-99. CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida.
- Gay, C.C., Prichett, L.C., Madson, W., 1988. Copper deficiency in ruminants, In: *Proceedings. 20th. Ann. Meet Am Assoc Bovine Pract.* 134-138.
- Gengelbach, G.P., Spears, J.W., 1998. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status cytokine production, and humoral immune response of calves. *J. Dairy Sci.* 81(12): 3286-3292.
- Gengelbach, G.P., Ward, J.D., Spears, J.W., 1997. Effect of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J. Anim. Sci.* 75: 112-1118.
- Gibson, D.M., Kennelly, J.J., Mathison, G.W., 1987. The performance of dairy and feedlot cattle fed sulphur dioxide-treated high-moisture barley. *Can J. Anim. Sci.* 68: 471-482.
- Givens, D.I., Hopkins, J.R., Brown, M.E., Walsh, W.A., 1981. The effect of copper therapy on the growth rate and blood composition of young growing cattle. *J. Agric. Sci.* 97: 497-505.
- Gleed, P.T., Allen, W.M., Mallinson, C.B., Rowlands, G.J., Sansom, B.F., Vagg, M.J., 1983. Effect of selenium and copper supplementation on the growth of beef steers. *Vet. Rec.* 103: 388.
- Gochfeld, M., 1997. *Factors Influencing Susceptibility to Metals*. 105 (4):817-822.
- Gollan, J.L., 1975. Studies on the nature of complexes formed by copper with human alimentary secretions and their influence on copper absorption in the rat. *Clin. Sci. Mol. Med.* 49: 237-245.
- González, F.J., Llena, J. 1994. Manejo del ternero de cebo. *Tratado de Veterinaria Práctica*. Boris nº 61. Madrid
- Goodman, J.R., Dallman, P.R., 1970. Role of copper in iron localization in developing erythrocytes. *Blood.* 34: 747.
- Gooneratne, S.R., Howell, J.McC., Gawthorne, J., 1979. Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Res. Vet. Sci.* 27: 30-37.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., 1980. Creatine kinase release and muscle changes in chronic copper poisoning in sheep. *Research in Veterinary Science.* 28: 351-361.
- Gooneratne, S.R., Howell, J.McC., Cook, R.D., 1980. An ultrastructural and morphometric study of the liver of normal and copper-poisoned sheep. *Am. J. Pathol.* 99: 429-450.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., 1983. Structural changes in the kidney of chronic copper poisoned sheep. En: *Proc. 2nd. Int. Workshop in Trace Element-Analytical Chemistry in Medicine and Biology*. Schramel, P., Bratter, P. (eds). Watter de Guyter, Boston, 34L.
- Gooneratne, R., Christensen, D.A., 1985. Gestation age and maternal-foetal liver copper levels in bovines. En: *Proc. 5th. Int. Symp. on Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Mills, C.F., Bremner, I., Chesters, J.K. (eds). Commolwealth Agricultural Bureaux, Farham Royal, U.K. 334.
- Gooneratne, S.R., Buckey W.T., Christensen, D.A., 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science.* 69: 819-845.
- Gooneratne, SR., Buckey, W.T., Christensen, D.A., 1989a. Review of copper defficiency and metabolims in ruminants. *Can J Anim Sci* 69: 819-845.
- Gooneratne, S.R., Howell, J. McC., Gawthorne, J.M., Kumaratilake, J.S., 1989b. Subcellular Distribution of Copper in the Kidneys of Normal, Copper-Poisoned, and Thiomolybdate-Treated Sheep. *J. Inorg. Biochem.* 35: 23-36.

- Gooneratne, S.R., Symonds, H.W., Bailey, J.V., Christensen, D.A., 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 315-325.
- Gooneratne, S.R., Christensen, D.A., 1997. Effect of Chelating Agents on the Excretion of Copper, Zinc and Iron in the Bile and Urine of Sheep. *Vet. J.* 153: 171-178.
- Goyer, R.A., 1986. Hepatic toxicity. En: *Casarett y Doull's toxicology: the basic science of poisons*. Klassen, C., Andur, M., Doull, J. (eds). 3rded. Pergamon Press, New York. 211.
- Goyer, R.A., 1995. Factors influencing metal toxicity. En: Goyer, R.A., Klaassen, C.D., Waalkes, M.P. (eds). *Metal toxicology*. Academic Press, San Diego, C. A. 31-45.
- Goyer, R.A., 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17 : 37-50.
- Grace, N.D., 1983. Amounts and distribution of mineral elements associated with the fleece-free empty body weight gains of the grazing sheep. *N. Z. J. Agric. Res.* 26: 59-70.
- Grace, N.D., Knowles, S.O., West, D.M., Lee, J., 2004. Copper oxide needles administered during early pregnancy improve the copper status of ewes and their lambs. *New Zealand Veterinary Journal.* 52(4): 189-192.
- Gregoriadis, G., Sourkes, T.L. 1967. Intracellular distribution of copper in the liver of the rat. *Can. J. Biochem.* 45: 5833-5837.
- Gregoriadis, G., Sourkes, T.L., 1970. Regulation of hepatic copper in the rat by the adrenal gland. *Can. J. Biochem.* 48: 160-163.
- Grings, E.E., Staigmiller, R.B., Short, R.E., Bellows, R.A., MacNeil, M.D., 1999. Effects of Stair-Step Nutrition and Trace Mineral Supplementation on Attainment of Puberty in Beef Heifers of Three Sire Breeds. *J. Anim. Sci.* 77: 810-815.
- Grobler, D.G., 1999. Copper poisoning in wild ruminants in the Kruger National Park: Geobotanical and environmental investigation. *J. Vet. Res.* 66: 81-93.
- Grobler, D.G., Swan, G.E., 1999a. Copper poisoning in the Kruger National Park: Field investigation in wild ruminants. *J. Vet. Res.* 66: 157-168.
- Grobler, D.G., Swan, G.E., 1999b. Attempted induction of chronic copper poisoning in boma confined impala. Onderstepoort *J. Vet. Res.* 66: 169-174.
- Gross, A.M., Prohaska, J.R., 1990. Copper-deficient mice have higher cardiac epinephric turnover. *J. Nutr.* 120: 88-96.
- Groten, J.P., Sinkeldam, E.J., Muys, T., Luten, J.B., Bladeren, P.J., 1991. Interactions of dietary Ca, P, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn and Se with the accumulation and oral toxicity of cadmium in rats. *Food Chem. Toxic.* 29: 249-258.
- Gummow, B., 1996. Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 63(4): 277-288.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388: 482-488.
- Hadrich, J., 1996. High amounts of copper in calf's livers. Recent data and estimation of potential health hazards. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 92 (4): 103-113.
- Hall, A.C., Young, B.W., Bremner, I., 1979. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *J. Inorg. Biochem.* 11: 57.
- Ham, A.W., Cormack, D.H., 1985. *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana, D.L. 8^{ed}.
- Hamaguchi, R.A., 1999. Innovative reclamation research at Highland Valley Copper. *Technical Paper. CIM Bulletin.* 92 (1033): 78-84.
- Hamar, D., Bedwell, C.L., 1997. Iatrogenic copper toxicosis induced by administering copper oxide boluses to neonatal calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(4): 441-443.

- Hamilton, S.J., Mehrle, P.M., Jones, J.R., 1987. Evaluation of metallothionein as a biological indicator of stress from cadmium on brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 551-560.
- Hanlon, J., Monks, E., Hughes, C., Weavers, E., Rogers, M., 2002. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp. Pathol.* 127(4): 280-289.
- Haralambie, G., Kreul, J., 1970. Das Verhalten von Serum-Coeruloplasmin und Kupfer bei langdauernder Körperbelastung. *Arzneimittel-Forsch* 24: 112-115.
- Harris, E.D., 1997. Copper. En: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. Eds B.L. O'Dell, R.A. Sunde. New York, Marcel Decker, 231-273.
- Harris, E.D., 2000. Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 291-310.
- Harris, E.D., 2001. Copper homeostasis: The role of cellular transporters. *Nutr. Rev.* 59(9): 281-285.
- Harris, Z.L., Gitlin, J.D. 1996. Genetic and molecular basic for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 836-841.
- Harrison, M.D., Dameron, C.T., 1999. Molecular mechanism of copper metabolism and the role of the Menkes disease protein. *J. Biochem. Molecular Toxicol.* 13(2): 93-105.
- Harrison, M.D., Jones, C.E., Dameron, C.T. 1999. Copper chaperones: function, structure, and copper-binding proteins. *JIBS*. 4: 145-153.
- Hart, E.B., Steenbock, H., Waddell, J., Elvehjem, C.A., 1928. Iron in nutrition. 7 Copper as a supplement to iron haemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.* 77: 797-812.
- Harter, R.D., 1979. Adsorption of copper and lead by Ap and B2 horizons of several Northeastern United States Soils. *Soil Sci. Am. J.* 43: 679.
- Hartman, H.J., Weser, U., 1977. Copper-thionein from fetal bovine liver. *Biochem. Biophys. Acta*. 491: 211-222.
- Hartman, F., van Ryssen, J.B.J., 1997. Metabolism of selenium and copper in sheep with and without sodium bicarbonate supplementation. *J. Agr. Sci.* 128: 357-364.
- Hayness, R.J., 1997. Micronutrient status of a group of soils in Canterbury, New Zealand, as measured by extraction with EDTA, DPTA y HCl, and its relationship with plant response to applied Cu and Zn. *J. Agr. Sci.* 129: 325-333.
- Haywood, S., Fuentealba, I.C., Foster, J., Ross, G. 1996. Pathobiology of copper-induced injury in Bedlington terriers: ultrastructural and microanalytical studies. *Anal. Cell. Pathol.* 10(3): 229-241.
- Haywood, S., Muller, T., Muller, W., Heinz-Erian, R., Tanner, M.S., Ross G., 2001. Copper-associated liver disease in North Ronaldsy sheep: A possible animal model for non-Wilsonian hepatic copper toxicosis of infancy and childhood. *J. Pathol.* 195(2): 264-269.
- Haywood, S., Muller, T., Mackenzie, A.M., Muller, W., Tanner, M.S., Heinz-Erian, P., Williams, C.L., Loughram, M.J., 2004. Copper-induced hepatotoxicosis with hepatic stellate cell activation and severe fibrosis in North Ronaldsay lambs: A model for non-Wilsonian hepatic copper toxicosis of infants. *J. Comp. Path.* 130(4): 266-267.
- Henry, R.B., Liu, J., Choudhuri, S., Klaassen C.D., 1994. Species variation in hepatic metallothionein. *Toxicol Letters*. 74: 23-33.
- Herbert, E., Small, J.N. W., Jones, D.G., Suttle, N.F., 1991. Evaluation of superoxide dismutase assays for the routine diagnostic assessment of copper status in blood samples. En: Momcilovic, B. (ed.) *Proceedings of the 7th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*, Dubrovnik. IML, Zagreb. 5(15): 5-16.
- Herd, D.B., 1990. Minerals-Does your supplement Program Need Fine Tuning. *Limousin World*. 130-139.

- Hidiroglou, M., Heaney, D.P., Martin, K.E., 1984. Copper poisoning in a flock of sheep. Copper excretion patterns after treatment with molybdenum and sulphur or penicillamine. *Can. Vet. J.* 25: 377-382.
- Hill, C.H., Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study of in-vivo and in-vitro interactions of transitions elements. *Fed. Proc.* 29: 1474.
- Hill, C.H., Matrone, G., Payne, W.L., Barber, C.W., 1963. In vivo interactions of cadmium with copper, zinc and iron. *J. Nutr.* 80: 227.
- Horn, N., Tumer, Z., 1999. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 12(4): 297-313.
- Howell, J.McC., Gopinath, C., 1977. Copper toxicity in sheep: the effects of repeated intravenous injections of copper sulphate. *Research in Veterinary Science.* 22: 86-94.
- Howell, J.McC., Kumaratilake, J.S., 1985. Observations on the morphological distribution of Cu loaded and necrotic hepatic parenchimal cells during the development of chronic copper poisoning in sheep. En: *Proc 5th. Int Symp on Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Mill, C.F. Bremner, J. and Chesters, J.K. (eds). Comonwealth Agricultural Bureaux, Farham Royal. U.K. 184.
- Howell, J.McC., Gooneratne, R.S., 1987. The patollogy of copper toxicity in animals. En: Howell, J.McC., Gawthorne, J.M. (eds.). *Copper in Animals and Man, vol. II*. CRC Press, Florida. 53-78.
- Humann-Ziehank, E., Coenen, M., Ganter, M., Bickhardt, K., 2001. Long-term observation of subclinical chronic copper poisoning in two sheep breeds. *J. Vet. Med. A.* 48(7): 429-439.
- Humphreys, D. J., 1990. *Toxicología veterinaria*. 3^a ed. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, Buenos Aires. 17: 85.
- Humphries, B., 1989. Treatment for copper poisoning. *Agric. Food Res.* Feb. 8:8.
- Humphries, W.R., Phillippo, M., Young, B.W., Bremner, I., 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Br. J. Nutr.* 49: 77-86.
- Humphries, W.R., Morrice, P.C., Bremner, I., 1988. A convenient method for the treatment of chronic copper poisoning in sheep using subcutaneous ammonium tetrathiomolybdate. *Vet. Rec.* 123: 51-53.
- Hunt, C.E., Landesman, J., Newberne, P.M., 1970. Copper deficiency in chicks: effects of ascorbic acid on iron, copper, cytochrome oxidase activity, and aortic mucopolysaccharides. *Br. J. Nutr.* 24: 607-614.
- Hussein K. S.M., Jones, B-E.V., Frank, A., 1985. Selenium copper interaction in goats. *Zbl.Vet. Med. A.* 32: 321-330.
- Hynes, M., Woods, M., 1975. Some studies on the Metabolism of Labelled Molybdenum Compounds in Cattle. *J. Inorg. Biochem.* 24: 279-288.
- Hyun, C., Lavulo, L.T., Filippich, L.J. 2004. Evaluation of haplotypes associated with copper toxicosis in Bedlington Terriers in Australia. *Am. J. Vet. Res.* 65(11): 1573-1579.
- Hyvarinen, H., Nygren, T., 1993. Accumulation of copper in the liver of moose in Finland. *J. Wildlife Manag.* 57 (3): 469-474.
- Igarza, L.M., Auza, Y., 1995. Molibdeno en rumiantes: aspectos fisiológicos y tóxicos. *Arch. Med. Vet.* 27(1): 5-13.
- Ivan, M.M., 1988. The effect of faunation of rumen on solubility and liver content of copper in sheep fed low or high copper diets. *J. Anim. Sci.* 66: 1498-1501.
- Jain, N.C. 1986. *Schalm's veterinary haematology*. 4th ed. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Jain, R.K., Gerlowski, L.G., 1981. Kinetics of uptake, distribution, and excretion of zinc in rats. *Ann. Biomed. Eng.* 9: 347-361.

- Jamieson, S., Alcroft, R., 1950. Copper pine of calves. *Br. J. Nutr.* 4: 86.
- Janssens, A.R., Bosman, F.T., Ruiter, D.J., Van der Hamer, C.J.A., 1984. Immunohistochemical demonstration of the cytoplasmic copper-associated protein in the liver in primary biliary cirrhosis: its identification as metallothionein. *Liver*. 4: 139-147.
- Jenkins, K.J., 1989. Effect of copper loading of preruminant calves on intracellular distribution of hepatic copper, zinc, iron, and molybdenum. *J. Dairy Sci.* 72: 2346-2350.
- Jenkins, K.J., Hidioglou, M., 1989. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 72: 150-156.
- Jenkins, K.J., Kramer, J.K.G., 1989. Influence of Excess Dietary Copper on Lipid Composition of Calf Tissues. *J. Dairy Sci.* 72: 2528-2591.
- Jenkinson, S.G., Lawrence, R.A., Burk, R.F., Williams, D.M., 1982. Effects of copper deficiency on the activity of the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3^{-2}$. *J. Nutr.* 112: 197.
- Jilg, T., Unglaub, W., Eckstein, B., 1997. Influence of copper supplementation in milk replacers on the copper concentration of calf livers. *Fleischwirtschaft*. 77(6): 559-562.
- Jobling, M.F., Huang, X., Stewart, L.R., Barnham, K., Curtainn, C., Volitakis, I., Perugini, M., White, A., Cherny, R., Masters, C., Barrow, C., Collins, S., Bush, A., Cappai, R., 2001. Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry*. 40 (27): 8073-8084.
- Johnson, N.C., Kheim, T., Kountz, W.B., 1959. Influence of sex hormones on total serum copper. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 102: 98-99.
- Johnson, G.F., Morell, R., Stockert, R.J., 1981. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatology*. 1: 243-248.
- Johnson, M.A., Murphy, C.L., 1988. Adverse effects of high dietary iron and ascorbic acid on copper status in copper-deficient and copper-adequate rats 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 96-101.
- Johnson, L.R., Engle, T.E., 2003. The Effects of Copper and Concentration on Lipid Metabolism in Growing and Finishing Angus Steers. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* 16(8): 1131-1136.
- Jones, D.G., Suttle, N.F., 1981. Some effects of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. *Res. Vet. Sci.* 31: 151-156.
- Jorhem, L., Sundstrom, B., Astrand, C., Haeggund, G., 1989. The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 188: 39-44.
- Judson, G., Brown, T.H., Gray, D., Dewey, D.W., Edwards, J.B., McFarlane, J.D., 1982. Oxidised copper wire particles for copper therapy in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 33: 1073.
- Judson, G.J., Brown, T.H., Gray, D., Dewey, D.W., Babidge, P.J., 1984. Oxidised wire as a copper supplement for sheep: a study of some variables which may alter copper availability. *Aust. Vet. J.* 61: 294-295.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. 2005. *Histología básica: texto y atlas*. Barcelona, Masson. 10^{ed}.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. *Trace elements in Soils and Plants*. 3rd ed. CRC Press, Inc. USA. 413.
- Kagi, J.H.R., Vallee, B.L., 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235: 3460-3465.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. Ed. Academic Press, Orlando.

- Kaplan, L.A., Pesce, A.J. 1990. *Química clínica. Técnicas de laboratorio. Fisiopatología. Métodos de análisis. Teoría, análisis y correlación*. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Kegley, E.B., Spears, J.W., 1994. Bioavailability of fed-grade copper sources (oxide, sulfate or lysine) in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 72: 2728-2734.
- Kerr, L.A., McGavin, H.D., 1991. Chronic copper poisoning in sheep grazing pastures fertilized with swine manure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 99-101.
- Khan, A.T., Diffay, B.C., Forester, D.M., Thompson, S.J., 1995. Trace element concentrations in tissues of goats from Alabama. *Vet. Human Toxicol.* 37(4): 327-329.
- Kim, S. P., Chao, Y., Allen, G. 1992. Inhibition of elevated hepatic glutathione abolishes copper deficiency cholesterolemia. *FASEB J.* 6: 2467-2471.
- Kitano, S., 1980. Membrane and contractile of rat vascular tissue in copper-deficient conditions. *Circ. Res.* 46: 681.
- Klauder, D.S., Murthy, L., Petering, H.G., 1972. Effect of dietary intake of lead acetate on copper metabolism in male rats. En: *Trace Substances in Environmental Health*. Hemphill, DD (ed). University of Missouri Press, Columbia. 11: 131.
- Knudsen, C.B., Bjornsdottir, I., Jons, O., Honoré Hansen, S., 1998. Detection of metallothionein isoforms from three different species using on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 265: 167-175.
- Koh, T.S., Judson, G.J., 1986. Trace elements in sheep grazing near a lead-zinc smelting complex at Port Pirie, South Australia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 87-95.
- Koh, T.S., Judson, G.J., 1987. Copper and selenium deficiency in cattle: an evaluation of methods of oral therapy and an observation of a copper-selenium interaction. *Vet. Rec.* 11: 133-148.
- Korte, C.J., Smith, D.R., Deaker, J.M., Scotland, T., Willimott, M., 1996. Copper and sulphur deficiencies and interactions with others factors in the Wairoa Region. *Unpublished survey report to New Zealand meat Research and Development Council*, Wellington.
- Kottferová, J., Koréneková, B., 1995. The effect of emissions on heavy metals concentrations in cattle from the area of an industrial plant in Slovakia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 400-405.
- Kottferová, J., Koréneková, B., 1997. Comparison of the occurrence of risk elements in bulls and dairy cows coming from the fallout region of a metallurgical plant on the territory of Slovakia. *Archiv fur Tierzucht.* 40(4): 309-316.
- Kraft, H. 1998. *Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Kramer, H.L., Steiner, J.W., Vallely, P.J., 1983. Trace element concentration in the liver, kidney and muscle of Queensland cattle. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 30: 588-594.
- Krebs, H.A., 1928. Über das kupfer in menschlichem Blutserum *Klin Wochenschr.* 7: 584-585.
- Kreuzer, W., Kracke, W., Sansoni, B., Wissmath, P., 1978. Untersuchungen über den Blei (lead) und Cadmium (cadmium) gehalt in Fleisch und Organen von Schkachttrindern. 1. *Rinder aus eienm wenig unweiltbelasteten Gebiet*. *Fleischwirtsch.* 6: 1022-1030.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., 1987. Histochemical study of the accumulation of copper in the liver of sheep. *Res. Vet. Sci.* 42: 73-81.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., 1989. Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep-a subcellular fractionation study. *J. Comp. Path.* 101 : 161-176.
- Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC., Gooneratne, S.R., 1981. Blood copper sorbitol dehydrogenase and acid phosphatase in copper poisoning. En: *Proc. 4th Int. Symp. On*

- Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Howell, J. McC. Gawthorne, J.M., White, C.L. (eds). Australian Academy of Sciences, Canberra. 457.
- L'Herroux, L.L., Le Roux, S., Appriou, P., Martinez, J., 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environ. Pollut.* 97(1-2): 119-130.
- Ladefoged, O., Stürup, S., 1995. Copper deficiency in cattle, sheep and horses caused by excess molybdenum from fly ash: A case report. *Vet. Human Toxicol.* 37(1): 63-65.
- Lahey, M.E., Gubler, C.J., Chase, M.S., Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M., 1952. Studies on copper metabolism. II. Hematologic manifestations of copper deficiency in swine. *Blood*. 7: 1053.
- Langlands, J.P., Donald, G.E., Smith, A.J., 1987. Analysis of data collected in a residue survey: copper and zinc concentrations in liver, kidney and muscle in Australian sheep and cattle. *Aust. J. Exp. Agric.* 27: 485-491.
- Larson, B.L., Arthington, J., Corah L.R., 1995. Recognizing and treating copper imbalances in cattle. *Vet. Med.* 90(6): 613-619.
- Laven, R.A., Livesey, C.T., Offer, N.W., Fountain, D., 2004. Apparent subclinical hepatopathy due to excess copper intake in lactating Holstein cattle. *Vet. Rec.* 155: 120-121.
- Lech, T., 2002. Lead, copper, zinc and magnesium content in hair of children and young people with some neurological diseases. *Boil. Trace Elem. Res.* 85: 111-126.
- Ledoux, D.R., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1996. Response to high dietary copper and duration of feeding time on tissue copper concentration in sheep. *Nutr. Res.* 16(1): 69-78.
- Lee, G.R., Nacht, S., Lukens, J.N., Cartwright, G.E., 1968. Iron metabolism in copper deficient swine. *J. Clin. Invest.* 47: 2058-2069.
- Lee, H.J., Jones, G.B., 1976. Interaction of selenium, cadmium and copper in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 27: 447-452.
- Lee, J., Treloar, B.P., Harris, P.M., 1994. Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosages. I. Characterization and turnover of metallothionein isoforms. *Aust. J. Agric. Res.* 45: 303-320.
- Lewis, N.J., Fallah-Rad, A.H., Connor, M.L., 1997. Copper toxicity in confinement-houses ram lambs. *Can. Vet. J.* 38: 496-498.
- Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Giofrè, F., Martino, D., Calò, M., Naccari, F., 2004. Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environ. Int.* 30(1): 1-6.
- Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M., Malpe, R., 2003. Iron and copper homeostasis and intestinal absorption. *Biometals.* 16(1): 145-160.
- Lindquist, R.R., 1968. Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. III. The effect of copper on rat liver lysosomes. *Am. J. Pathol.* 53: 903-922.
- Littledike, E.T., Young, L.D., 1993. Effect of sire and dam breed on copper status of fat lambs. *J. Anim. Sci.* 71(3): 774-778.
- Littledike, E.T., Wittum, T.E., Jenkins, T.G., 1995. Effect of breed, intake and carcass composition on the status of several macro and trace minerals of adult beef cattle ¹. *J. Anim. Sci.* 73: 2113-2119.
- Livesey, C.T., 2002. Investigation of copper poisoning in adult cows by veterinary laboratories agency. *Cattle Practice.* 10: 289-294.
- Loneragan, J.F., 1981. Distribution and movement of copper in plants. En: *Copper in Soils and Plants*. Loneragan, J.F.; Robson, A.D., Graham, R.D. (eds). Academic Press, New Cork. 165.

- López Alonso, M., 1999. Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Galicia. *Tesis Doctoral*, Universidade de Santiago de Compostela.
- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R., 2000a. Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *Sci. Total Environ.* 246: 237-248.
- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Shore, R., 2000b. The effect of pig farming on copper and zinc accumulation in cattle in Galicia (North-Western Spain). *Vet. J.* 160: 259-266.
- López Alonso, M., Benedito, J.L., Miranda, M., Hernández, J., Shore, R.F., 2002. Interactions between toxic and Essential Trace Metals in Cattle from a Region with Low Levels of Pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 165-172.
- López Alonso, M., Prieto Montaña, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2004. Interactions between toxic (As, Cd and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *BioMetals.* 17: 389-397.
- López Alonso, M., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L. 2005a. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. *Vet. J.*, 169: 262-267.
- López Alonso, M., Prieto, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L. 2005b. Intracellular distribution of copper and zinc in the liver of copper-exposed cattle from northwest Spain. *Vet. J.*, 170: 332-338.
- López Alonso, M., Crespo, A., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2006. Assesment of some blood parameters as potencial markers of hepatic copper accumulation in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 71-75.
- Loué, A., 1988. *Los microelementos en Agricultura*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 107-154.
- Luza, S.C., Speiky, H.C., 1996. Liver copper storage during development: Implications for cytotoxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63(3): 812-820.
- Lynne, L., Charmley, H., Symonds, W., Mallinson, C.B., 1982. The clearance of copper from the plasma of cattle and its excretion in bile during the intravenous infusion of copper sulphate solutions. *Proc. Nutr. Soc.* 41: 81A.
- Ma, W., 1996. Lead in mammals. En: Beyer, W.N.; Heinz, G.H.; Redmon-Norwood, A.W. (eds). *Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations. SETAC Special Publication Series*. CRC. Lewis Publishers, New York. 281-296.
- Manual Merck de Veterinaria. 2000. 5ª ed. Ed. Océano, Barcelona.
- Mackenzie, A.M., Allinworth, D.V., Jackson, D.W., Teifer, S.B., 1997. A comparison of methods of assessing copper status in cattle. In *Trace Elements in Man and Animals*, TEMA 9. Eds. P.W.F. Fischer, M.R. L'Abbé, K. A. Cackell, R.S. Gibson. NRC Research Press. Banff, Alberta, Canada. 301-302
- Maiorka, P.C., Massoco, C.O., 1998. Copper Toxicosis in Sheep: A Case Report. *Vet. Human Toxicol.* 40 (2): 99-100.
- Marcilese, N. A., Ammerman, C. B., Valsecchi, R., Dunavant, B. G., Davis, G. K. 1969. Effect of Dietary Molybdenum and Sulfate upon Copper Metabolism in sheep^{1,2}. *Journal of Nutrition.* 99(2): 177-183.
- Margoshes, M., Vallee, B. L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814.
- Mason, R.F., Brady, F.O., Webb, M., 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate: accumulation of Cu in the gastrointestinal tract of the newborn rat. *Br. J. Nutr.* 45: 391-399.

- Mattioli, G.A., Ramírez, C.E., Giuliadori, M.J., Tittarelli, C.M., Yano, H., Matsui, T., 1996. Characterization of cattle copper deficiency in the Magdalena district. *Livest. Prod. Sci.* 47: 7-10.
- McAllister, J.S.V., 1976. Studies in Northern Ireland on problems related to the disposal of slurry. *Agric. Water Qual.* 418-431.
- McArdle, H., 1992. The transport of iron and copper across the cell membrane: different mechanism for different metals. *Proc. Nutr. Soc.* 51: 199-209.
- McAuslan, B.R., Hannan, G.N., Reilly, W., Wittaker, R.G., Florence, M., 1980. Reappraisal of evidence for the role of copper in angiogenesis. En: *Symp. On the Importance of Copper in Biology and Medicine*. McAuslan, B.R., (ed). C.S.I.R.O., Canberra, 42.
- McFarlane, J.D., Judson, J.D., Gouzos, J., 1990. Copper deficiency in ruminants in the South East of Australia. *Aust. J. Agri. Res.* 30: 187-193.
- McFarlane, J.D., Judson, J.D., Turnbull, R.K., Kempe, B.R., 1991. An evaluation of copper-containing soluble glass pellets, copper oxide particles and injectable copper as supplements for cattle and sheep. *Aust. J. Exp. Agric.* 31: 165-174.
- McKee, D.J., Frieden, E., 1971. Binding of transition metal ions by ceruloplasmin (ferroxidase). *Biochemistry.* 10: 3880-3883.
- McMurray, C.H., 1980. Copper deficiency in ruminants. En: *Biological Roles of copper*. Ciba Foundation 79 (New Series) Elsevier, New York, 183-207.
- McPherson, A., 1983a. Oral treatment on trace element deficiencies in ruminant livestock. En: *Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice*. Suttle, N.F.; Gunn, R.G.; Allen, W.M.; Linklater, K.A., Wiener, G. (eds). Occasional Publications No.7, British Society for Animal Production, 93.
- McPherson, A., 1983b. Copper oxide wire for the bovine. En: *Trace elements in Animal Production and Veterinary Practice*. Suttle, N.F.; Gunn, R.G.; Allen, W.M.; Linklater, K.A.; Wiener, G. (eds). Occasional of Publication, No.7. *British Society for Animal Production*, Edinburg, 140.
- McPherson, A., Hemingway, R.G., 1965. Effects of protein intake on the storage of copper in the liver of sheep. *J. Sci. Food Agric.* 16: 220-227.
- McPherson, A., Milne, E.M., MacPherson, A.J., 1997. Copper poisoning in ewes. *Vet. Rec.* 141: 631.
- Mehra, R.K., Bremner, I., 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. *Biochem. J.* 219: 539-546.
- Mercer, J., Barnes, N., Stevenson, J., Strausak, D., Llanos, R.M., 2003. Copper-induced trafficking of the Cu-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals.* 16(1): 175-184.
- Mercer, J.F.B., 1997. Gene regulation by copper and the basis for copper homeostasis. *Nutrition.* 13(1): 48-49.
- Mercer, J.F.B., 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7(2): 64-69.
- Michaelson, I.A., Sauerhoff, M.W., 1973. The effect of chronically ingested inorganic lead on brain levels of Fe, Zn, Cu and Mn of 25-day old rats. *Life Sci.* 13: 417.
- Miller, J.K., Ramsey, N., Madsen, F.C., 1993. Elementos vestigiales. En: *El Rumiente: fisiología digestiva y nutrición*. Church, C.D. (ed). Zaragoza: Acribia, 391-457.
- Mills, C.F., 1954. Copper complexes in grassland herbage. *Biochem. J.* 57: 603-610.
- Mills, C.F., 1956. Studies on the copper compounds in aqueous extracts of herbage. *Biochem. J.* 63: 187-190.

- Mills, C.F., 1987. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. *J. Anim. Sci.* 65: 1702-1711.
- Mills, C.F., Dalgarno, A.C., 1972. Copper and zinc status of ewes and lambs receiving increased dietary concentration of cadmium. *Nature*. 239: 171.
- Mills, C.F., Dalgarno, A.C., Wenham, G., 1976. Biochemical and pathological changes in tissues of Frisian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br. J. Nutr.* 35: 309.
- Milltimore, J.E., Mason, J.L., 1971. Copper to molybdenum ratio and molybdenum and copper concentrations in ruminants feeds. *Canadian J. An. Sci.* 51: 193-200.
- Milne, D.B., 1994. Assessment of copper status. *Clin Chem* 40: 1479-1484.
- Minatel, L., Carfagnini, J.C., 2002. Evaluation of the diagnostic value of plasma copper levels in cattle. *Prev. Vet. Med.* 53(1-2): 1-5.
- Minson, D.J., 1990. Copper. En: *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press, Sydney. 316-324.
- Miranda, M., 1999. Estudio de los principales elementos contaminantes en ganado vacuno de Asturias. *Tesis doctoral*, Universidade de Santiago de Compostela.
- Miranda, M., López Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2000. Effect of sex on arsenic, cadmium, lead, copper and zinc accumulation in calves. *Vet. Human Toxicol.* 42(5): 265-268.
- Miranda, M., López Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Benedito, J.L., 2005. Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environ. Int.* 31: 543-548.
- Miranda, M., Cruz, J.M., López Alonso, M., Benedito, J.L., 2006. Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season. *Animal Science*, 82(2): 253-258.
- Miyajima, H., Takahashi, Y., Kono, S., 2003. A ceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism. *Biometals*. 16(1): 205-213.
- Morales, M. S., Palmquist, D.L., Weiss, W.P., 2000. Effects of Fat Source and Copper on Unsaturation of Blood and Milk Triacylglycerol Fatty Acids in Holstein and Jersey Cows¹. *J. Dairy Sci.* 83: 2105-2111.
- Morales, M. S., Palmquist, D.L., Weiss, W.P., 2000. Milk Fat Composition of Holstein and Jersey Cows with Control or Depleted Copper Status and Fed Whole Soybeans or Tallow¹. *J. Dairy Sci.* 83: 2112-2119.
- Mulhern, S.A., Koller, L.D., 1988. Severe or marginal copper deficiency results in a graded reduction of the mimime status in mice. *J. Nutr.* 118: 1041-1047.
- Mullis, L.A., Spears, J.W., McCraw, R.L., 2003. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *J. Anim. Sci.* 81(1): 318-322.
- Mullis, L.A., Spears, J.W., McCraw, R.L., 2003. Estimated copper requirements of Angus and Simmental heifers. *J. Anim. Sci.* 81(4): 865-873.
- NRC (National Research Council). 2004. *Nutrient requirements of beef cattle*. 7th revised edition. National Academy of Sciences, Washington DC.
- Nederbragt, H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Wensvoort, P., 1984. Pathobiology of copper toxicity. *Vet. Q.* 6: 179-235.
- Nicholson, J.K., Osborn, D., Kendall, M.D., 1984. Comparative distributions of zinc, cadmium, and mercury in the tissues of experimental mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 77(2): 249-256.

- Nicholson, F.A., Chambers, B.J., Williams, J.R., Unwin, R.J., 1999. Heavy metals content of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresour. Technol.* 70: 23-31.
- Nordberg, M. y Nordberg, G.F., 2000. Toxicological aspects of metallothionein. *Cel. Mol. Biol.* 46(2): 451-463.
- O'Halloran, T.V., Culotta, V.C., 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol. Chem.* 275: 25057-25060.
- O'Leary, J.A., Spellacy, W.N., 1968. Serum copper alteration after ingestion of an oral contraceptive. *Science.* 162: 682.
- Oh, S.H., Deagan, J.T., Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1978. Biological function of metallothionein. Its induction in rats by serious stresses. *Am. J. Physiol.* 234(3): E282-E285.
- Olsson, I.M., Oskarsson, A., 2001. Sampling of kidneys from cattle and pigs for cadmium analysis. *Analyst.* 126(1): 114-120.
- Opazo, C., Barriá, M.I., Ruiz, F.H., Inestrosa, N.C., 2003. Copper reduction by copper binding and its relation to neurodegenerative diseases. *Biometals.* 16(1): 91-98.
- Ortolani, E.L., Machado, C.H., Araripe, M.C., 2003. Assessment of some clinical and laboratory variables for early diagnosis of cumulative copper poisoning in sheep. *Vet. Human Toxicol.* 45: 289-293.
- Oshiro, S., Nozawa, K., Hori, M., Zhang, C., Hashimoto, Y., Kitajima, S., 2002. Modulation of iron regulatory protein-1 by various metals. *Biochem. Biophys. Res.* 290: 213-218.
- Oskarsson, A., Norrgren, L., 1998. Copper pipes as a source of copper exposure in man and environment. *Environ. Rev.* 6: 139-150.
- Parkinson, R.J., Yells, R., 1985. Copper content in soil and herbage following pig slurry application to grassland. *J. Agric. Sci.* 105: 183-185.
- Patel, B.N., Dunn, R.J., David, S., 2000. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 275: 4305-4310.
- Paynter, D.I. 1980. The role of dietary copper, manganese, selenium and vitamin E in lipid peroxidation in tissues of the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 2: 121.
- Paynter, D.I., Caple, I.W., 1984. Age-Related Changes in Activities of the Superoxide Dismutase Enzymes in Tissues of the Sheep and the Effect of Dietary Copper and Manganese on these changes. *J.Nutr.* 114: 1909-1916.
- Pena, M.M.O., Lee, J., Thiele, D.J., 1999. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*, 129(7): 1251-1260.
- Perrin, D.J., Schiefer, B., Blakley, B.R., 1990. Chronic copper toxicity in a dairy herd. *Can. Vet. J.* 31: 629-632.
- Perry, G., Taddeo, M.A., Petersen, R.B., Castellani, R.J., Harris, P.L.R., Siedlak, S.L., Cash, A.D., Liu, Q., Nunomura, A., Atwood, C.S., Smith, M.A., 2003. Adventitiously-bound redox active iron and copper are at the centre of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals.* 16: 77-81.
- Pesti, M.G., Bakalli, R.I., 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. *Poult. Sci.* 75: 1086-1091.
- Petering, H.G., 1980. The influence of dietary zinc and copper on the biological effects of orally ingested lead in the rat. *Amn. N. Y. Acad. Sci.* 355: 298.
- Phillippo, M., 1983. The role of dose response trials in predicting trace element deficiency disorders. En: Trace Elements in Animal Production and Veterinary Practice. Suttle, N.F., Gunn, R.G., Allen, W.M., Winklatter, K.A. y Wiener, G. (eds). *Occasional publication of the British Society of Animal Production.* Edinburgh. 7: 51-59.

- Phillippo, M., Humphries, W.R., Lawrence, C.B., Price, J., 1982. Investigation of the effect of copper therapy on fertility in beef suckler herds. *J. Agr. Sci.* 99: 359-364.
- Phillippo, M., Graca, D.S., 1983. Biliary copper secretion in cattle. *Proc. Nutr. Soc.* 42, 46A.
- Piscator M., 1979. Copper. En: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Vouk VB. (eds).. Elsevier, Amsterdam. 411-420.
- Poole, D.B.R., McGrath, D., Fleming, G.A., Moore, W., 1990. Effects of applying copper-rich pig slurry to grassland. *Irish. J. Agr. Res.* 29: 34-40.
- Popesko, P. 1998. *Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos*, 2ª ed. Barcelona.
- Porter, H., 1964. Tissue copper proteins in Wilson's disease. *Arch. Neurol.* 11: 341-349.
- Porter, H., Wiener, W., Barker, M., 1961. The intracellular distribution of copper in immature liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 52: 419-423.
- Poulsen, H.D., 1998. Zinc and copper as feed additives, growth factors or unwanted environmental factors. *J. Anim. Feed Sci.* 7: 135-142.
- Price, J., Chesters, J.K., 1985. A new bioassay for assessment of copper bioavailability and its application in a study of the effect of molybdenum on the distribution of available copper in ruminant digesta. *Br. J. Nutr.* 53: 323-336.
- Prohaska, J.R., Bailey, W.R., 1995. Offspring of female brindled mice fed a copper-deficient diet develop anaemia. *Fed. Proc.* 45: 235.
- Prohaska, J.R., Gutsch, 1983. Development of Glutathione Peroxidase Activity During Dietary and Genetic Copper Deficiency. *Biological Trace Element Research.* 5: 35-45.
- Prohaska, J.R., Heller, L.J., 1982. Mechanical properties of the copper-deficient rat heart. *J. Nutr.* 112: 2142.
- Prusiner, S.B., 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522.
- Pufahl, R.A., Singer, C.P., Peariso, K.L., Lin, S.J., Schmitdt, P.J., Fahrni, C.J., Curlotta, V.C., Penner-Hahn, J.E., O'Halloran, T.V., 1997. Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Atx1. *Science.* 278: 853-856.
- Puls, R., 1994. *Mineral Levels in Animal Health*, 2nd ed. Diagnostic Data, Sherpa International, Clearbook, BC. 83: 109.
- Purdey, M., 2000. Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant cofactors Cu, Se, Fe, Zn. *Med. Hypotheses.* 54(2): 278-306.
- Quiroz-Rocha, G.F., Bouda, J., 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet. Méx.* 32(4): 289-296.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Mc Graw-Hill Interamericana, 9ª ed., Madrid.
- Rahil-Khazen, R., Bolann, B.J., Ulvik, R.J., 2002. Correlations of trace elements levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *BioMetals.* 15: 87-98.
- Ramirez Perez, A.H., Buntinx, S.E., Rosiles, R., 2000. Effect of breed and age on the voluntary intake and the micromineral status of non-pregnant sheep II. Micromineral status. *Small Ruminant Research.* 37(3): 231-242.
- Real Decreto 1201/2005 (10 de octubre) sobre protección de os animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *BOE* núm. 252, 21 de octubre de 2005.
- Riet-Correa, F., Oliveira, J.A., Giesta, S., Schild, A.L., Méndez, M.C., 1989. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 9(3/4): 51-54.

- Riordan, J.R., Richards, V., 1980. Human fetal liver contains both zinc-and copper-rich forms of metallothionein. *J. Biol. Chem.* 255: 5380-5383.
- Rock, E., Mazur, A., O'Connor, J.M., Bonham, M.P., Rayssiguier, Y., Strain, J.J., 2000. The effect of copper supplementation on red blood cell oxidizability and plasma antioxidants in middle-aged healthy volunteers. *Free Radical Biol. Med.* 28: 324-329
- Roeser, H.P., Lee, G.R., Cartwright, G.E., 1970. Role of ceruloplasmin (plasma ferroxidase) in hyperferremia associated with chronic inflammation and endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 1155-1158.
- Rosenberger, G. 1977. *Enfermedades de los bóvidos*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Rosenzweig, A.C., O'Halloran, T.V., 2000. Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 140-147.
- Roth, J.A., Feng, L., Dolan, K.G., Lis, A., Garrick, M.D., 2003. Copper-binding proteins in human erythrocytes: searching for potential biomarkers of copper over-exposure. *Biomaterials*. 16(1): 42-50.
- Rucker, R.B., Romero-Chapman, N., Wong, T., Lee, J., Steinberg, F.M., McGee, C., Clegg, M.S., Reiser, K., Kosonen, T., Uriu-Hare, J.Y., Murphy, J., Keen, C.L., 1996. Modulation of lipoxygenase by dietary copper in the rat. *J. Nutr.* 126: 51-60.
- Rucker, R.B., Tinker, D., 1977 Structure and metabolism elastin. En: *International Review of Experimental Pathology*. Vol.17 Richter, GW and Epstein, MA, Eds; Academic Press, New York.
- Russanov, E., Banskalieva, V., Ljutakova, S., 1981. Influence of sex hormones on the subcellular distribution of copper in sheep liver. *Res. Vet. Sci.* 30: 223.
- Saenko, E.L., Yaroplov, A.I., Harris, E.D., 1994. Biological functions of ceruloplasmin expressed through copper-binding sites. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 7: 69-88.
- Salisbury, C.D.C., Chan, W., Saschenbrecker, P., 1991. Multielement concentrations in liver and kidneys tissues from five species of Canadian slaughter animals. *J. AOAC Int.* 74(4): 587-591.
- Sansinanea, A., Cerone, S., Auza, N., 1995. Copper poisoning in sheep: the treatment with ammonium tetra-thiomolybdate. *Rev. Med. Vet.* 75: 150-154.
- Sargison, N.D., Scott, P.R., 1996. The diagnosis and treatment of chronic copper poisoning in 4- to 12- week-old single-sucked calves. *Agric. Pract. Toxicol.* 17(3-4): 36-40.
- Sato, M., Bremner, I., 1984. Biliary excretion of metallothionein and a possible degradation product in rats injected with copper and zinc. *Biochem. J.* 223: 475-479.
- Saylor, W.W., Leach, R.M., 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110: 448-459.
- Saylor, W.W., Morrow, F.D., Leach, R.M., 1980. Copper- and zinc-binding proteins in sheep liver and intestine: Effects of dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110: 460-468.
- Scheuhammer, A.M.; Cherian, M.G., 1986. Quantification of metallothionein by cadmium saturation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417.
- Scheuhammer, A.M., Cherian, M.G., 1991. Quantification of metallothionein by silver saturation. *Methods in enzymology*. 205: 78-83.
- Seawright, A.A., 1982. Animal health in Australia. Chemical and plants poisons, *Australian Bureau of animal health*, Australian, Government Publishing Service, Canberra, 157.
- Selkoe, D.J., 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275: 630-631.

- Simpson, D.M., Beynon, R.J., Robertson, D.H.L., Loughran, M.J., Haywood, S., 2004. Copper-associated liver disease: A proteomics study of copper challenge in a sheep model. *Proteomics* 4(2): 524-536.
- Sisson, S.; Grossman, J.D. 2005. *Anatomía de los animales domésticos*. 5^{ed}. Barcelona
- Smart, M.E., 1984. Factors influencing plasma and liver copper and zinc in beef cattle. *Desertion*, Saskatchewan, University of Saskatchewan.
- Smart, M.E., Christensen, D.A., 1982. Is supplementation of the cow during pregnancy with copper, zinc or selenium of any benefit to the calf. *Proc. 3rd West Nutr. Cong.* 81-87.
- Smart, M.E., Cymbaluk, N.F., Christensen, D.A. 1992. A review of copper status of cattle in Canada and recommendations for supplementation. *Can. Vet. J.* 33, 163-170.
- Smith, R. M., 1980. Copper and the growth of the central nervous system: observations in fetal and neonatal lambs. En: *CSIRO Symp on the importance of copper in Biology and Medicine*. Mc Auslam, B.R. (ed). C.S.I.R.O., Canberra. 92: 65.
- Smith, B.S.W., Field, A.C., Suttle, N.F., 1968. Effect of intake of copper, molybdenum and sulphate on copper metabolism in sheep. III. Studies with radioactive copper in mate castrated sheep. *J. Comp. Pathol.* 78: 449-461
- Smith, B., Woodhouse, D.A., Frazer, A.J., 1975. I fields investigations *N.Z. Vet. J.* 23: 73.
- Smith, R.M., Griel, L.C., Muller, L.D., Leach, R.M., Baker, D.E., 1991a. Effects of dietary cadmium chloride throughout gestation on blood and tissue metabolites of primigravid and neonatal dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69: 4088-4096.
- Smith, R.M., Leach, R.M., Muller, L.D., Griel, L.C., Baker, D.E., 1991b. Effects of long-term dietary cadmium chloride on tissue milk and urine mineral concentration lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69: 4088-4096.
- Smith, G.M., White, C.L., 1997. A molybdenum-sulfur-cadmium interaction in sheep. *Austr. J. Agric. Res.* 48: 147-154.
- Sobocinski, P.Z., Canterbury, W.J.Jr., Mapes, C.A., Dinterman, R.E., 1978. Involvement of hepatic metallothionein in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am. J. Physiol.* 234(3): E399-E406.
- Soli, N.E., 1980. Chronic copper poisoning in sheep. *Nordisk Vet. Med.* 32: 75.
- Sorenson, J.R. J., 1978. An evaluation of altered copper, iron, magnesium, manganese and zinc concentrations in rheumatoid arthritis. *Inorg. Perspect. Biol. Med.* 2: 1-26.
- Speisky, H., Navarro, P., Cherian, M.G., Jimenez, I., 2003. Copper-binding proteins in human erythrocytes: Searching for potential biomarkers of copper over-exposure. *Biometals.* 16: 113-123.
- Spengler, S.D., 1989. PCB as acute cause of a chronic diseases in sheep. *Tierarztl Umsch.* 48: 800-806.
- Spierenburg, T.J., De Graaf, G.N., Baars, A.J., Brus, D.H.J., Tielen, M.J.M., Arts, B.J., 1988. Cadmium, zinc, lead and copper in livers and kidneys of cattle in the neighbourhood of zinc refineries. *Environ. Monit. Assess.* 11: 107-114.
- Sprinkle, J.E., Cuneo, S.P., Frederick, H.M., Enns, R.M., Schafer, D.W., Carstens, G.E., Daugherty, S.B., Noon, T.H., Rickert, B.M., Reggiardo, C., 2006. Effects of a long-acting, trace mineral, reticulorumen bolus on range cow productivity and trace mineral profiles. *J. Anim. Sci.* 84: 1439-1453.
- Steffen, D.J., Carlson, M.P., Casper, H.H., 1997. Copper toxicosis in suckling beef calves associated with improper administration of copper oxide boluses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9(4): 443-446.
- Sternlieb, I., 1980. Copper and liver. *Gastroenterology.* 78: 1615-1628.

- Stoszed, M.J., Mika, P.G., Oldfield, J.L., Weswig, P.H., 1986. Influence of copper supplementation on blood and liver copper in cattle fed tall fescue or quackgrass. *J. An. Sci.* 62: 263-271.
- Strausak, D., Mercer, J.F.B., Dieter, H.H., Stremmel, W., Multhaupt, G., 2001. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain res Bull.* 55: 175-185.
- Sugawara, N., Sugawara, C., 1984. Comparative study of effect of acute administration of cadmium and silver on ceruloplasmin and metallothionein: involvement of disposition of copper, iron, and zinc. *Environ. Res.* 35: 507-515.
- Sugawara, N., Sugawara, C., 1987. Relationship between ceruloplasmin and Cu status involving metallothionein induced by several heavy metals in the mouse. *Arch. Toxicol.* 59: 432-436.
- Sullivan, J.M., Janovitz, E.B., Robinson, F.R., 1991. Copper toxicosis in veal calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 161-164.
- Sunderman, F.W., Nomoto, S., 1970. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical Chemistry* 16: 903-910.
- Sutherland, R.J., Deol, H.S., Hood, P.J., 1992. Changes in plasma bile acids, plasma amino acids, and hepatic enzymes pools as indices of functional impairment in liver-damaged sheep. *Vet. Clin. Pathol.* 21(2): 51-56.
- Suttle, N.F., 1981. Comparison between parenterally administered copper complexes of their ability to alleviate hypocupraemia in sheep and cattle. *Vet. Rec.* 109: 304-307.
- Suttle, N.F., 1983. Use of erythrocyte copper: zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Research in Veterinary Science.* 35: 47-52.
- Suttle, N.F., 1983a. Effects of molybdenum concentration in fresh herbage, hay and semi-purified diets on the copper metabolism of sheep. *J. Agr. Sci.* 100: 651-656.
- Suttle, N.F., 1983b. Assessing the mineral and trace element status of feeds. En: *Proceeding of the second symposium of the international Network of Feed Information Centres*. Robards, GE; Packham, RG (eds). Commonwealth. Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. 211-237.
- Suttle, N.F., 1986. Copper deficiency in ruminants: recent developments. *Vet. Rec.* 119: 519-422.
- Suttle, N.F., 1987. The nutritional requirement for copper in animals and man. En: *Copper in Animals and Man*. Howell, JMcC. And Gawthorne, J.M. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. 1: 21-44.
- Suttle, N.F., 1991. The interactions between copper, molybdenum and sulphur in ruminant nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 121-140.
- Suttle, N., 1993. Overestimation of copper deficiency. *Vet. Rec.* 133: 123-124.
- Suttle, N.F., 1994. Meeting the copper requirements of ruminants. En: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Garnyworthy, P.C.; Cole, D.J.A. (eds). Nottingham University Press, Nottingham. 173-188.
- Suttle, N.F., 2003. Differential diagnosis of micronutrient-responsive disorders in beef suckler herds. *Cattle Pract.* 11: 161-166.
- Suttle, N.F., Field, A.C., Barlow, R.M., 1970. Experimental copper deficiency in sheep. *J. Comp. Pathol.* 80: 151.
- Suttle, N.F., Angus, K.W., 1976. Experimental copper deficiency in the calf. *J. Comp. Pathol.* 86: 595-608.

- Suttle, N.F., Angus, K.W., 1978. Effects of experimental copper deficiency on the skeleton of the calf. *J. Comp. Pathol.* 88: 135-145.
- Suttle, N.F., McMurray, C.H., 1983. Use of erythrocyte copper: Zinc superoxide dismutase activity and hair or free concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 35: 47-52.
- Suttle, N.F., Abrahams, P., Thornton, I., 1984. The role of a soil X dietary sulphur interactions in the impairment of copper absorption by ingested soil in sheep. *J. Agric. Sci.* 103: 81.
- Suttle, N.F., Peter, D.W., 1985. Rumen sulphide metabolism as a major determinant of copper availability in the sheep's diet. En: *Proc. 5th. Int. Symp. On Trace Element Metabolism in Man and Animals*. Mills, C.F.; Bremner, I.; Chesters, J.K. (eds). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, U.K. 367.
- Suttle, N.F., Bremner, J., 1996. A comparison of the availability of copper in copper: lysine and copper sulphate for sheep. *An. Sci.* 62: 690.
- Suttle, N.F., MacPherson, A., Phillips, P., Wright, C.C., 1999. The influence of trace elements status on the pre-weaning growth of lambs on improved hill pastures in Scotland. I. Copper, molybdenum, sulphur and iron. *J. Agr. Sci.* 10: 125-129.
- Suttle, N.F., Lewis, R.M., Smal, N.W., 2002. Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *An. Sci.* 75: 295-302.
- Suzuki, K.T., Yamamoto, K., Ogra, Y., Kanno, S., Aoki, Y. 1994. Mechanisms for removal of copper from metallothionein by tetrathiomolybdate. *J. Inorg. Biochem.* 54: 157-165.
- Taylor, G.G., Bettger, W.J., Bray, T.M., 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defence system in rats. *J. Nutr.* 118: 613-621.
- Terao, T., Owen, C.A., 1977. Nature of copper compounds in liver supernates and bile of rats: studies with ⁶⁷Cu. *Am. J. Physiol.* 224: 682-686.
- Terres-Martos, C., Navarro-Alarcon, M., Martin-Lagos, F., Lopez de la Serrana, H., Lopez Martinez, M.C., 1997. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci. Total Environ.* 198: 97-103.
- Tessman, R.K., Lakritz, J., Tyler, J.W., Casteel, S.W., Williams, J.E., Dew, R.K., 2001. Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *JAVMA.* 218(5): 756-760.
- Thompson, K.G., Audige, L., Arthur, D.G., Juhan, A.F., Orr, M.B., McSporran, K.D., Wilson, P.R., 1994. Osteochondrosis associated with copper deficiency in young farmed red deer and wapiti X red deer hybrids. *N. Z. Vet. J.* 42: 137-143.
- Tokarnia, C.H., Dobereiner, J., Peixoto, P.V., Moraes, S.S., 2000. Outbreak of copper poisoning in cattle fed poultry litter. *Vet Human Toxicol.* 42(2): 92-95.
- Tremblay, R.R.M., Baird, J.D., 1991. Chronic copper poisoning in two holstein cows. *Cornell Vet.* 81: 205-213.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F., 2002. *Los minerales en la nutrición del ganado*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- Van Campen, D.R., Scaife, P.U., 1967. Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.* 91: 473.
- Van der Berg, R., Levels, F.H., van der Schee, W., 1983. Breed differences in sheep with respect to the accumulation of copper in the liver. *Vet. Q.* 5: 26-31.
- Van der Schree, S., Van der Berg, S., 1983. Levels of enzyme activities in blood serum as indicators of a high copper status in sheep flocks. *Zbl. Vet. Med. A.* 30: 664-673.

- Van der Watt, H.v.H., Summer, M.E., Cabrera, M.L., 1994. Bioavailability of copper, manganese, and zinc in poultry litter. *J. Environ. Qual.* 23: 43-49.
- Van Ryssen, J.B.J., Barrowman, P.R., 1987. Effect of ionophores on the accumulation of copper in the livers of sheep. *Anim. Prod.* 44: 255-261.
- Van Wyk, J.J., Baxter, J.H., Akeroyd, J.H., Motulsky, A.G., 1953. The anaemia of copper deficiency in dogs compared with that produced by iron deficiency. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 93: 41.
- Vasak, M., 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. En: *Methods in Enzymology*. Abelson, JN; Simon, MI (eds). Academic, San Diego CA, USA. 452-458.
- Vermunt, J.J., West, D.M., 1994. Predicting copper status in beef cattle using serum copper concentrations. *N. Z. Vet. J.* (42): 194-195.
- Vilafranca, M., 1997. Gestión y tratamiento de los purines en porcino. *Producción Animal*. 125: 38-47.
- VLA Surveillance Report, 2001. July sees an increased incidence of copper poisoning in cattle. *Vet. Rec.* 149: 257-260.
- Wada, Y., Kajiwar, W., Kato, A., 1995. Wilson's disease-like lesion in a calf. *Vet. Pathol.* 32: 538-539.
- Wakatsuki, T. 1995. Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.* 14: 169-177.
- Ward, S.G., 1993. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulphate) on copper status, performance, and immune response in growing steer fed diets with or without supplemental molybdenum and sulphur. *J. Anim. Sci.* 71: 2748-2755.
- Ward, J.D., Spears, J.W., Gengelbach, G.P., 1994. Differences in Copper Status and Copper Metabolism among Angus, Simmental and Charolais Cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 571-577.
- Weast, R.C., 1978. *CRC Handbook of chemistry and physics*. 59th edition, CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., Marion, R.S., Castell, S.W., Loiacono, C.M., Turk, J.R., 1999. Subclinical copper accumulation in llamas. *Can. Vet. J.* 40: 422-424.
- Webb, M., 1972. Binding of cadmium ions by rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 2751-2765.
- Webb, M., 1979. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. *Topics in environmental health*. Vol. 2. Ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 195-266.
- Wentink, G.H., Smolders, G., Boxem, T., Wensing, T., Muller, K.E., Van den Top, A.M., 1999. Lack of clinical abnormalities in dairy heifers with low blood and liver copper levels. *Vet. Rec.* 145: 258-259.
- Wentink, G.H., Wensing, T., Baars, A.J., van Beek, H., Zeeuwen, A.A.P.A., Schotman, A.J.H., 1988. Effects of cadmium on some clinical and biochemical measurements in heifers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 131-138.
- Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1970. Effects of some copper antagonistic on induction of ceruloplasmin in the rat. *J. Nutr.* 100: 341-348.
- Whanger, P.D., Weswig, P.H., 1971. Effect of supplementary zinc on the intracellular distribution of hepatic copper in rats. *J. Nutr.* 101: 1093-1098.
- Whitelaw, A., Russel, A.J.F., Armstrong, R.H., Evans, C.C., Fawcett, A.R., 1983. Studies in the prophylaxis of induced copper deficiency in sheep grazing resseeded hill pastures. *Anim. Prod.* 37: 441-448.
- Whitelaw, A., Fawcett, A.R., McDonald, A.J., 1984. Cupric oxide needles in the bovine hypocuprosis. *Vet. Rec.* 115: 357.

- Wiener, G., Suttle, N.F., Field, A.C., Herbert, J.G., Woolliams, J.A., 1978. Breed differences in copper metabolism in sheep. *J. Agr. Sci. Cambridge*. 91: 433-441.
- Wiener, G., Wilmut, I., Woolliams, C., Woolliams, J.A., Field, A.C., 1984a. The role of the breed of lamb in determining the copper status of the lamb. 1. Under a dietary regime low in copper. *Anim. Prod.* 39: 207-217.
- Wiener, G., Wilmut, I., Woolliams, C., Woolliams, J.A., Field, A.C., 1984b. The role of the breed of lamb in determining the copper status of the lamb. 2. Under a dietary regime moderately high in copper. *Anim. Prod.* 39: 219-227.
- Wikse, S.E., Herd, D., Field, R., Holland, P., 1992. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *JAVMA*. 200(11): 1625-1629.
- Wilkinson, J.M., Hill, J., Livesey, C.T., 2001. Accumulation of potentially toxic elements in the body tissues of sheep grazed on grassland given repeated applications of sewage sludge. *An. Sci.* 72: 179-190.
- Wittenberg, K.M., Boila, R.J., Shariff, M.A., 1990. Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molybdenum diets. *Can. J. An. Sci.* 70: 895-904.
- Woolliams, J.A., Suttle, N.F., Wiener, G., Field, A.C., Woolliams, C., 1982. The effect of breed of sire on the accumulation of copper in lambs with particular reference to copper toxicity. *Anim. Prod.* 35: 299-307.
- Woolliams, J.A., Suttle, N.F., Wiener, G., Field, A.C., Woolliams, C., 1983. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *J. Agric. Sci. Camb.* 100: 441-449.
- Woolliams, J.A., Wiener, G., Woolliams, C., Suttle, N.F., 1985. Retention of copper in the liver of sheep genetically selected for high and low concentrations of copper in plasma. *Anim. Prod.* 41: 219-226.
- Woolliams, J.A., Woolliams, C., Suttle, N.F., Jones, D.G., Wiener, G., 1986. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. 1. Differences in mortality. *Anim. Prod.* 43: 293-301.
- Xin, Z., Waterman, F., Hemken, R.W., Harmon, R.J., 1991. Effects of Copper Status on Neutrophil Function, Superoxide Dismutase and Copper Distribution in Steers. *J. Dairy Sci.* 74: 3078-3085.
- Xin, Z., Silvia, W.J., Waterman, D.F., Hemken, R.W., Tucker, W.B., 1993. Effect of copper status on luteinizing hormone secretion in dairy steers. *J. Dairy Sci.* 76: 437-444.
- Yost, G.P., Arthington, J.D., McDowell, L.R., Martin, F.G., Wilkinson, N.S., Swenson, S.K., 2002. Effect of copper source and level on the rate and extent of copper repletion in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 85(12): 3297-3303.
- Zervas, G., Nikolaou, E., Mantzios, A., 1990. Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats. *Anim. Prod.* 50: 497-506.